

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

Cambios proteómicos y del metabolismo energético en un modelo *in vitro* de interacción epitelio-mesenquimal de cáncer de páncreas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Antonio López Martín

Directores

**Eduardo Díaz-Rubio García
Miguel Martín Jiménez
Luis Gonzaga Paz-Ares Rodríguez**

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**CAMBIOS PROTEÓMICOS Y DEL
METABOLISMO ENERGÉTICO EN UN MODELO
IN VITRO DE INTERACCIÓN EPITELIO-
MESENQUIMAL DE CÁNCER DE PÁNCREAS.**

**MEMORIA PARA ACCEDER AL GRADO DE DOCTOR DE:
JOSÉ ANTONIO LÓPEZ MARTÍN**

Directores:

Prof. D. Eduardo Díaz-Rubio García.

Prof. D. Miguel Martín Jiménez.

Prof. D. Luis Gonzaga Paz-Ares Rodríguez.



Prof. D. Eduardo Díaz-Rubio García, Catedrático de Oncología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario San Carlos, de Madrid,

Prof. D. Miguel Martín Jiménez, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Gregorio Marañón, de Madrid,

Prof. D. Luis Gonzaga Paz-Ares Rodríguez, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario 12 de Octubre, de Madrid,

CERTIFICAN que

D. José Antonio López Martín, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección, en el laboratorio de Oncología Traslacional del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre de Madrid, el trabajo titulado **“CAMBIOS PROTEÓMICOS Y DEL METABOLISMO ENERGÉTICO EN UN MODELO IN VITRO DE INTERACCIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL DE CÁNCER DE PÁNCREAS”**,

considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Madrid a 12 de Octubre de 2015.

VºBº de los Co-Directores

El Interesado,

Prof. Eduardo Díaz Rubio García

D. José Antonio López Martín

Prof. Miguel Martín Jiménez

Prof. Luis Gonzaga Paz-Ares Rodríguez

DEDICATORIA.

A los que sufren o sufrieron por culpa de una enfermedad sin tratamiento eficaz, empezando por José Antonio (mi padre) y por Ángel.

A los que generosamente me apoyan o apoyaron durante cada día en mi esfuerzo por identificar y desarrollar mi motivo de existencia.

A Sergio, Héctor y Ana: ellos constituyen mi gran motivo de existencia.

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres, hermanas y abuelos les debo gran parte de lo que soy y he realizado en mi vida.

Eduardo, Miguel y Luis son, además de mis directores de tesis, referentes en mi carrera profesional. Han influido positivamente en mi formación como Oncólogo Médico y me han ayudado a tomar decisiones importantes relacionadas con mi trayectoria profesional.

Hernán, Cecilia y Pepe han sido jefes que han sabido orientarme y motivarme profesionalmente y me han apoyado, sin saberlo, en momentos personales difíciles.

Teresa, Vanesa, Elena, Alba y Carlos han aportado tiempo, entusiasmo, conocimiento técnico y sentido común para poder materializar el desarrollo del laboratorio de Oncología Traslacional y de nuestros proyectos de investigación. Inés nos ha facilitado adentrar en el complejo mundo de la proteómica. En paralelo, Carmen, Raquel, Marisa, Analía, Blanca y Lucía, han permitido que viese la luz la Unidad de Estudios Clínicos en Fase Temprana en Oncología, nuestra querida UFTO. Todos son un ejemplo de constancia, paciencia, superación, entusiasmo, compromiso y rigor metodológico.

Teresa, además, ha ejercido generosamente un papel crítico en las distintas fases de desarrollo del presente proyecto de investigación, para lo cual nunca podré estar lo suficientemente agradecido.

Las Fundaciones Mutua Madrileña y Ricardo Carpio han participado en la subvención económica de este proyecto. El personal de la Fundación para la Investigación Biomédica Hospital Universitario 12 de Octubre, dirigido por Mar, ha permitido formalizar correctamente la gestión económica de este proyecto.

Las personas con cáncer que confiaron en mi capacidad para ayudarlas me ayudaron a mí, tanto en mis decisiones como enseñándome a identificar los límites que la Medicina tiene.

Son muchos mis compañeros de trabajo y colaboradores en mis distintas posiciones laborales en Madrid, Vitoria y Guadalajara a los que agradezco el haber contribuido a forjarme como médico. Sois demasiados para poder nombraros a todos y además correría el riesgo de omitir a alguno involuntariamente.

A mis hijos, Héctor y Sergio y a Ana, mi compañera de vida. Ellos son el origen, el medio y el destino de mi impulso por ser mejor persona, mejor médico, mejor investigador.

Gracias.



CONTENIDO.

DEDICATORIA.	5
AGRADECIMIENTOS.	7
ÍNDICE DE TABLAS.	13
ÍNDICE DE FIGURAS.	15
GLOSARIO.	19
1. RESUMEN.	25
2. SUMMARY.	31
3. INTRODUCCIÓN.	39
3.1. El cáncer de páncreas es una enfermedad genética compleja, de mal pronóstico.	39
3.2. La transición epitelio-mesenquimal promueve la diseminación del tumor.	42
3.3. El estroma estimula y regula la EMT del tumor.	46
3.4. En el estroma tumoral existen fibroblastos activados.	48
3.4.1. Origen de los CAFs.	49
3.4.2. Marcadores de los CAFs.	50
3.5. La transición epitelio-mesenquimal en el cáncer de páncreas.	51
3.6. Proteómica.	54

4. HIPÓTESIS.	61
5. OBJETIVOS.	65
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	69
6.1. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS.....	69
6.1.1. Líneas celulares y medios de cultivo.	69
6.1.2. Obtención de una línea celular estable de fibroblastos LC5 que expresan GFP.	73
6.1.3. Co-cultivos directos entre líneas celulares de cáncer de páncreas y fibroblastos humanos.....	76
6.1.4. Cultivos de líneas celulares de cáncer de páncreas con medio condicionado (secretoma) de fibroblastos humanos.....	78
6.1.5. Co-cultivos en cámaras Transwell®.....	79
6.2. ESTUDIOS FUNCIONALES DE MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR.....	80
6.2.1. Ensayos de cierre de herida o cicatrización.....	80
6.2.2. Ensayos de migración - invasión celular.....	83
6.3. MODIFICACIONES MOLECULARES GLOBALES EN FIBROBLASTOS Y TUMOR.	84
6.3.1. Expresión de α -SMA en los fibroblastos expuestos a tumor.	85
6.3.2. Expresión de FGF-7/KGF inducida por tumor.....	86
6.3.3. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (Western Blot).....	88
6.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO: ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-D).	89
6.4.1. Preparación de las muestras, extracción y cuantificación de proteínas.....	89
6.4.2. Electroforesis bidimensional.....	91
6.4.3. Electroforesis diferencial bidimensional en gel: 2D-DIGE (<i>Differential In-Gel Electrophoresis</i>).....	93

6.4.4. Identificación de proteínas por Espectrometría de Masas (MS).	100
6.4.5. Metodología para la interpretación de los resultados de proteómica.	102
6.5. METABOLISMO CELULAR BIOENERGÉTICO EN LÍNEAS TUMORALES PANCREÁTICAS Y FIBROBLASTOS.	104
6.5.1. Condiciones de cultivo.	104
6.5.2. Análisis cuantitativo de proteínas del metabolismo (RPPMA, <i>Reverse phase protein microarray</i>).	104
6.5.3. Análisis estadístico.	109
7. RESULTADOS.	113
7.1. ESTABLECIMIENTO Y OPTIMIZACIÓN DE CO-CULTIVOS.	113
7.1.1. Producción de Fibroblastos LC5-GFP ⁺ .	113
7.1.2. Co-cultivos directos en 2-D entre líneas tumorales de páncreas y fibroblastos.	113
7.2. ESTUDIOS FUNCIONALES DE MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR.	117
7.2.1. Ensayos de cierre de herida o cicatrización.	117
7.2.2. Ensayos de migración e invasión celular.	126
7.3. MODIFICACIONES MOLECULARES GLOBALES EN FIBROBLASTOS Y TUMOR.	128
7.3.1. Inducción de la expresión fibroblástica de α -SMA.	129
7.3.2. Inducción de la secreción de FGF-7/KGF (Factor de Crecimiento de Queratinocitos).	131
7.3.3. Pérdida de expresión de E-Cadherina en el tumor.	132
7.4. MODIFICACIONES PROTEÓMICAS DURANTE LA INTERACCIÓN ENTRE FIBROBLASTOS Y CÉLULAS TUMORALES.	133
7.4.1. Línea tumoral Capan-1.	133

7.4.2. Línea tumoral PL45.	140
7.4.3. Línea de Fibroblastos LC5 cultivados con Capan-1.	148
7.4.4.- Línea de Fibroblastos LC5 cultivados con PL45.	154
7.4.5. Interpretación funcional de los resultados de la proteómica por DIGE.	159
7.5. MODIFICACIONES DEL METABOLISMO ENERGÉTICO DURANTE LA INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS TUMORALES Y FIBROBLASTOS.	169
7.5.1. Modelo Capan-1.	171
7.5.2. Modelo PL45.	173
7.5.3. Análisis comparativo entre co-cultivos.	175
8. DISCUSIÓN.	181
9. CONCLUSIONES.	213
10. PUBLICACIONES (199).	217
11. BIBLIOGRAFÍA.	223
12. APÉNDICE.	237



ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1. ESQUEMA GENERAL DEL PROYECTO.	69
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DIFERENCIALES ENTRE LAS LÍNEAS CELULARES OBJETO DE ESTUDIO	71
TABLA 3. PAREJAS DE COMPARACIONES DIGE.	99
TABLA 4. PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO ESTUDIADAS	105
TABLA 5. NÚMERO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE PRESENTES EN EL GEL DE CAPAN-1	134
TABLA 6. RELACIÓN DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS CUYA ABUNDANCIA VARÍA EN EL CULTIVO DE CAPAN-1 + SECRETOMA LC5 VERSUS CAPAN-1	136
TABLA 7. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS CUYA ABUNDANCIA DIFIERE EN CO-CULTIVOS CAPAN-1 + LC5 FRENTE A CAPAN-1	138
TABLA 8. CAPAN-1: CO-CULTIVOS (CAPAN-1 + FIBROBLASTOS LC5) VERSUS CULTIVOS (CAPAN-1) EN MEDIO CONDICIONADO (LC5): PROTEÍNAS IDENTIFICADAS CON DIFERENTE ABUNDANCIA.	140
TABLA 9. NÚMERO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE PRESENTES EN EL GEL DE PL45.....	141
TABLA 10. PL45: PROTEÍNAS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN CULTIVOS DE PL45 CON SECRETOMA DE LC5 VS MONO-CULTIVOS DE PL45.....	143
TABLA 11. PROTEÍNAS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN CO-CULTIVOS PL45 + FIBROBLASTOS LC5, RESPECTO A PL45.	145
TABLA 12. RELACIÓN DE SPOTS PROTEICOS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN LA COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE CO-CULTIVOS (PL45 + FIBROBLASTOS LC5) VERSUS CULTIVOS DE PL45 EN MEDIO CONDICIONADO LC5.....	147
TABLA 13. RESUMEN DE LAS VARIACIONES EN EL GEL DE FIBROBLASTOS CULTIVADOS CON CÉLULAS O SECRETOMA DE LA LÍNEA CAPAN-1	148

TABLA 14. PROTEÍNAS CON DIFERENTE ABUNDANCIA IDENTIFICADAS EN CO-CULTIVOS DE FIBROBLASTOS LC5 CON CAPAN-1 VS MONO-CULTIVO	150
TABLA 15. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN CULTIVOS DE FIBROBLASTOS LC5 CON SECRETOMA DE CAPAN-1 FRENTE A MONO-CULTIVOS DE LC5. (M4 / M1)	152
TABLA 16. PROTEÍNAS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN CO-CULTIVOS FIBROBLASTO + CAPAN-1 FRENTE A MONOCULTIVOS CON FIBROBLASTOS. (M2 / M4)	153
TABLA 17. RESUMEN DE LAS VARIACIONES EN EL GEL DE FIBROBLASTOS CULTIVADOS CON CÉLULAS O SECRETOMA DE LA LÍNEA PL45	154
TABLA 18. PROTEÍNAS CON DIFERENCIAS EN SU ABUNDANCIA EN CO-CULTIVOS DE FIBROBLASTOS CON PL45 FRENTE A MONO-CULTIVOS DE FIBROBLASTOS. (M3 / M1)	156
TABLA 19. PROTEÍNA IDENTIFICADA CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN CULTIVOS DE FIBROBLASTOS CON SECRETOMA DE PL45 FRENTE A MONO-CULTIVOS DE FIBROBLASTOS (M5 / M1)	157
TABLA 20. PROTEÍNAS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN FIBROBLASTOS LC5 CRECIDOS CON SECRETOMA DE PL45 VS CO-CULTIVADOS CON PL45 (M5 / M3)	159
TABLA 21. PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EN CO-CULTIVOS: CAPAN-1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	173
TABLA 22. PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EN CO-CULTIVOS: PL45. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	175
TABLA 23. PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EN CO-CULTIVOS CAPAN-1 Y PL45. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	177
TABLA 24. PROTEÍNAS QUE VARÍAN EN LÍNEA SOMETIDA A ESTRÉS, RESPECTO A LÍNEA PARENTAL EN CONDICIONES ÓPTIMAS DE CULTIVO (107)	188
TABLA 25. PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS (DIGE) EN LAS LÍNEAS CELULARES ESTUDIADAS: LISTADO ALFABÉTICO Y DESCRIPCIÓN FUNCIONAL	191
TABLA 26. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON METABOLISMO ENERGÉTICO (DIGE +ARRAY DE PROTEÍNAS): LISTADO Y DESCRIPCIÓN FUNCIONAL	204



ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. CAMBIOS CELULARES ASOCIADOS A LA EMT (15)*	43
FIGURA 2. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA EMT POR TGF- β (22)*	45
FIGURA 3. EFECTOS DIFERENCIALES DE TGF- β SEGÚN LA EXPRESIÓN DE SMAD4 (54)	53
FIGURA 4. FOTOGRAFÍAS EN MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES DE LAS LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS EN EL ESTUDIO.	72
FIGURA 5. PRODUCCIÓN DE FIBROBLASTOS LC5 GFP ⁺	75
FIGURA 6. PRINCIPIO DE LA SEPARACIÓN CELULAR FACS-(SORTING DE CÉLULAS ASOCIADO A FLUORESCENCIA) (76).	76
FIGURA 7. CO-CULTIVOS DIRECTOS DE CÉLULAS TUMORALES Y FIBROBLASTOS	77
FIGURA 8. CO-CULTIVOS INDIRECTOS DE LÍNEAS DE CÁNCER DE PÁNCREAS CON MEDIO CONDICIONADO (SECRETOMA) DE FIBROBLASTOS.	79
FIGURA 9. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UNA CÁMARA DE CULTIVO TRANSWELL®	80
FIGURA 10. ESQUEMA DE TRABAJO CON IBIDI® CULTURE-INSERTS.	82
FIGURA 11. PLACAS TRANSWELL® (A, B) Y RESERVORIO SUPERIOR (C) CON CÉLULAS EN LA MEMBRANA TEÑIDAS CON HEMATOXILINA (D).	84
FIGURA 12. ELISA QUANTIKINE HUMAN KGF/FGF-7: RECTA PATRÓN.	88
FIGURA 13. ELECTROFORESIS 2D DE EXTRACTOS PROTEICOS DE LAS LÍNEAS CELULARES	93
FIGURA 14. ESQUEMA DE LA REALIZACIÓN DE LA ELECTROFORESIS DIFERENCIAL BIDIMENSIONAL (2D- DIGE) CON LOS EXTRACTOS PROTEICOS OBTENIDOS DE LAS LÍNEAS CELULARES TUMORALES.	94
FIGURA 15. DIGE: DISEÑO DEL MARCAJE CON FLUOROCROMOS I: LÍNEAS TUMORALES	95
FIGURA 16. DIGE: DISEÑO DEL MARCAJE CON FLUOROCROMOS II: FIBROBLASTOS	95
FIGURA 17. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA VARIACIÓN DE LA INTENSIDAD Y LA DIFERENCIA DE POTENCIAL (V) DURANTE EL PROGRAMA DE ISOELECTROENFOQUE DE LOS GELES DIGE. EJEMPLOS DE CAPAN-1 (ARRIBA) Y FIBROBLASTOS (DEBAJO).	97
FIGURA 18. DIGE: LEYENDA DE LOS COLORES DE LOS FLUOROCROMOS.	98

FIGURA 19. VALIDACIÓN DE ANTICUERPOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE METABOLISMO ENERGÉTICO.....	106
FIGURA 20. CURVAS ESTÁNDAR PARA LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS EN EL ARRAY (EN LÍNEA CELULAR TUMORAL HCT-116 CÁNCER DE COLON)	108
FIGURA 21. MATRIZ DE PROTEIN-ARRAY DISEÑADA PARA ESTE ESTUDIO.....	109
FIGURA 22. FIBROBLASTOS LC5-GFP ⁺ TRAS FACS SORTING	113
FIGURA 23. OPTIMIZACIÓN DE CO-CULTIVOS DE LÍNEAS TUMORALES PANCREÁTICAS Y FIBROBLASTOS GFP ⁺	114
FIGURA 24. MICROFOTOGRAFÍAS DE LOS CO-CULTIVOS EN LAS CONDICIONES ÓPTIMAS.....	115
FIGURA 25. FACS PARA LA SEPARACIÓN CELULAR (SORTING) DE LOS CO-CULTIVOS.....	116
FIGURA 26. LÍNEA TUMORAL CAPAN-1 CULTIVADA CON EL SECRETOMA DE FIBROBLASTOS LC5 (0,5% FBS).	118
FIGURA 27. LÍNEA TUMORAL PL45 CULTIVADA CON EL SECRETOMA DE FIBROBLASTOS LC5 (0,5% FBS).....	119
FIGURA 28. FIBROBLASTOS LC5 CULTIVADOS CON EL SECRETOMA DE LAS LÍNEAS TUMORALES CAPAN-1 O PL45 (0,5% FBS).	120
FIGURA 29. SCRATCH ASSAY: DETALLE DE LA MIGRACIÓN DE FIBROBLASTOS CULTIVADOS CON EL SECRETOMA DE CAPAN-1, A LAS 48 HORAS (20x).....	121
FIGURA 30. CO-CULTIVO DIRECTO CAPAN-1 / FIBROBLASTOS LC5.....	121
FIGURA 31. CO-CULTIVO DIRECTO CAPAN-1-FIBROBLASTOS LC5, A LAS 24 HORAS DE LA “HERIDA”.	122
FIGURA 32. DETALLE DE LA MIGRACIÓN DE CO-CULTIVOS CAPAN-1-FIBROBLASTOS LC5-GFP ⁺ , A LAS 72 HORAS.....	122
FIGURA 33. MIGRACIÓN CELULAR EN CÁMARAS DE CULTIVO CON INSERTOS IBIDI: CONTROLES..	123
FIGURA 34. MIGRACIÓN CELULAR EN CULTIVOS CON INSERTO IBIDI: FIBROBLASTOS LC5-GFP ⁺ (PARTE INFERIOR) Y CÉLULAS TUMORALES CAPAN-1 (PARTE SUPERIOR).....	124
FIGURA 35. MIGRACIÓN CELULAR EN CULTIVOS CON INSERTOS IBIDI: FIBROBLASTOS LC5-GFP ⁺ (PARTE INFERIOR) Y CÉLULAS TUMORALES PL45 (PARTE SUPERIOR).....	125
FIGURA 36. MIGRACIÓN/INVASIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CAPAN-1 (TRANSWELL).	127
FIGURA 37. MIGRACIÓN/INVASIÓN DE CÉLULAS PL45 (TRANSWELL).	127
FIGURA 38. CUANTIFICACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES (TRANSWELL)	128
FIGURA 39. ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS LC5-GFP ⁺ EN CO-CULTIVOS.....	130
FIGURA 40. INCREMENTO DE KGF INDUCIDO POR EL CO-CULTIVO.....	131
FIGURA 41. EXPRESIÓN DE E-CADHERINA EN LA LÍNEA CAPAN-1 (WESTERN BLOT).....	132

FIGURA 42. COMPARACIÓN ENTRE CAPAN-1 CULTIVADA CON SECRETOMA DE LC5 VS CAPAN-1.	135
FIGURA 43.- COMPARACIÓN ENTRE PROTEOMAS DE CAPAN-1 CO-CULTIVADAS CON FIBROBLASTOS LC5 VS CAPAN 1 EN MONO-CULTIVO (CAPAN B vsA).	137
FIGURA 44. COMPARACIÓN ENTRE CO-CULTIVOS CAPAN-1 + LC5 VS CULTIVO DE CAPAN-1 CON SECRETOMA DE LC5 (CAPAN B/CAPAN C).	139
FIGURA 45. COMPARACIÓN ENTRE PL45 CULTIVADO CON SECRETOMA DE FIBROBLASTOS LC5 VS PL45 (PL45 C/PL45 A).	142
FIGURA 46. PL45: CO-CULTIVO CON LC5 VS MONO.CULTIVO (PL45 B / PL45 A).	144
FIGURA 47. PL45: CO-CULTIVOS CON FIBROBLASTOS LC5 FRENTE A CULTIVOS CON SECRETOMAS DE LC5 (PL45 B / PL45 C)	146
FIGURA 48. FIBROBLASTOS LC5: COMPARACIÓN DEL MONO-CULTIVO VS EL CO-CULTIVO CON CAPAN-1 (M1 / M2).	149
FIGURA 49. FIBROBLASTOS LC5: MONO-CULTIVO FRENTE A CULTIVO CON SECRETOMA DE CAPAN-1 (M1 / M4).	151
FIGURA 50. FIBROBLASTOS LC5: CO-CULTIVOS CON CAPAN-1 VS CULTIVO CON SECRETOMA DE CAPAN-1 (M2 / M4).	153
FIGURA 51. COMPARACIÓN ENTRE PROTEOMAS DE FIBROBLASTOS LC5 EN MONO-CULTIVO VS CO-CULTIVO CON PL45 (M1 / M3)	155
FIGURA 52. COMPARACIÓN ENTRE PROTEOMAS DE FIBROBLASTOS LC5 VS FIBROBLASTOS CRECIDOS CON SECRETOMA DE PL45 (M1 / M5).	157
FIGURA 53. COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE FIBROBLASTOS LC5 CRECIDOS CON SECRETOMA DE PL45 VS CO-CULTIVADOS CON PL45 (M5 / M3).	159
FIGURA 54. DISTRIBUCIÓN DE LAS VARIACIONES DE LA ABUNDANCIA DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS, JERARQUIZADAS POR LÍNEA CELULAR Y CONDICIÓN.	160
FIGURA 55. KEGG: VÍA MIOCARDIOPATÍA ARRITMOGÉNICA DEL VENTRÍCULO DERECHO.	162
FIGURA 56. KEGG: VÍAS DE LAS ENFERMEDADES POR PRIONES.	164
FIGURA 57. KEGG: PROCESAMIENTO DE PROTEÍNAS EN RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.	164
FIGURA 58. KEGG: PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS.	165
FIGURA 59. KEGG: "SPLICEOSOMA"	165
FIGURA 60. ANÁLISIS GO DE LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN PL45	166
FIGURA 61. KEGG: UNIONES GAP.	168
FIGURA 62. MATRICES DE ARRAY DE PROTEÍNAS EN FASE REVERSA REALIZADOS.	169
FIGURA 63. PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EN CO-CULTIVOS: CAPAN-1	172
FIGURA 64. PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EN CO-CULTIVOS: PL45	174

ÍNDICES

FIGURA 65. PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EN CO-CULTIVOS CAPAN-1 Y PL45.	176
FIGURA 66. TRÁFICO DE HSP60 EN LA CÉLULA TUMORAL (182).....	202



GLOSARIO.

α-KG	<i>Alpha-ketoglutarate.</i>
α-SMA	<i>alpha smooth muscle actin.</i>
Abundancia	<p>El significado de este término, aplicado a las proteínas, es equivalente al que se usa en relación con los elementos químicos (1). La "abundancia" de un elemento químico indica, en términos relativos cuán común es, o cuánto existe de dicho elemento comparado con otros elementos químicos. Se puede medir o expresar la "abundancia" de varias formas, por ejemplo mediante la fracción de masa (igual a la fracción de peso), o fracción molar (fracción de átomos, o a veces fracción de moléculas, en el caso de gases), o en función de la fracción volumétrica.</p> <p>Esta acepción, como tal, no está incluida en el Diccionario de la R.A.E. (23ª Ed, 2014) 1. f. Gran cantidad. 2. f. Prosperidad, riqueza o bienestar.</p>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate.</i>
β-F1	<i>ATP synthase, F1 complex, β subunit.</i>
BMO	<i>Bone morphogenetic protein.</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer Type 2 susceptibility protein.</i>
CAF	<i>Carcinoma-associated fibroblast.</i>
CD31	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule.</i>
CDK4	<i>Cyclin-dependent kinase 4.</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (nombre del gen de p16).</i>
COL6A1	<i>Collagen, type VI, alpha 1.</i>
CORE-2	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial.</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2.</i>

COXII	Cytochrome c oxidase subunit 2.
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole (fluorescent stain).
DIA	Differential In-gel Analysis.
DNA	Deoxyribonucleic acid.
DPC4	Deleted in Pancreatic Carcinoma Gene 4.
EDTA	Ácido etil-diamino-tetra-acético.
EGF	Epidermal growth factor.
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.
EMT	Epithelial mesenchymal transition.
EndMT	Endothelial-mesenchymal transition.
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting.
FAD	Flavin adenine dinucleotide.
FAP	Prolyl endopeptidase FAP.
FBS	Fetal bovine serum.
FGF / FGFR	Fibroblast growth factor/ Fibroblast growth factor Receptor.
FH	Fumarate hydratase.
FSP-1	Fibroblast-specific protein 1.
G1-S	Transición entre las fases G1 y S del Ciclo Celular.
G6PDH	Glucose-6-phosphate dehydrogenase.
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase.
GFP	Green Fluorescent Protein.
GO	Gene Ontology (Database).
HADHA	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / 3-ketoacyl-CoA thiolase / enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), alpha subunit.
Hedgehog	Hedgehog signalling pathway.
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.
HGF	Hepatocyte growth factor.
HIF1	Hypoxia-inducible factor 1.
bHLH	basic Helix-Loop-Helix.
HSP60	Heat shock protein 60.
IF1	Inhibitor protein of the mitochondrial F1/F0-ATPase.
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

KGF	<i>Keratinocyte Growth Factor.</i>
KRAS	<i>GTPasa Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog.</i>
LDHA	<i>Lactate Dehydrogenase A.</i>
MADH4	<i>Sinónimo del gen DPC4.</i>
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization.</i>
MALDI-TOF/TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization /Time-Of-Flight.</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase.</i>
mRNA	<i>Messenger RiboNucleic Acid.</i>
MS	<i>Mass Spectrometry.</i>
NAD⁺	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide.</i>
NDUFS3	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3, mitochondrial.</i>
NG2	<i>E3 ubiquitin-protein ligase RNF5.</i>
Notch	<i>Neurogenic locus notch homolog protein 1.</i>
OXPHOS	<i>Sistema de fosforilación oxidativa.</i>
P16	<i>Proteína P16 (el gen se denomina CDKN2A).</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline.</i>
PDGF / PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor/ Platelet-derived growth factor Receptor.</i>
PDHe	<i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase 2, mitochondrial.</i>
Pen-Strep	<i>Solución de Penicilina y Estreptomicina, para medios de cultivo.</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase.</i>
PK-M2	<i>Pyruvate kinase isoenzyme type M2.</i>
RAS	<i>Rat sarcoma viral oncogene homolog.</i>
RNA	<i>Ribo nucleic acid.</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species.</i>
RPMI	<i>Medio de cultivo "Roswell Park Memorial Institute".</i>
RPPMA	<i>Reverse phase protein microarray.</i>
RUNX3	<i>Runt-related transcription factor 3.</i>
S100A4	<i>S100 calcium-binding protein A4.</i>
SAM	<i>S-Adenosyl methionine.</i>
SDF	<i>Stromal cell-derived factor.</i>

SDHB	<i>Succinate dehydrogenase (ubiquinone) B.</i>
SDS-PAGE	<i>Dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.</i>
Shh	<i>Sonic Hedgehog.</i>
SMAD	Otro nombre con el que se conoce al gen <i>DPC4</i> . Es una fusión de acrónimos que denominan a proteínas con las que tienen homología: MAD, en <i>Drosophila</i> sp (<i>mothers against decapentaplegic</i>) y SMA, en <i>Caenorhabditis elegans</i> (de <i>small</i>).
SPARC	<i>Secreted protein acidic and rich in cysteine.</i>
SNAI1	<i>Snail Family Zinc Finger 1.</i>
SOD2	<i>Superoxide dismutase 2, mitochondrial.</i>
SPP1	<i>Secreted Phosphoprotein , Osteopontin.</i>
Stem	Referente a características troncales, indiferenciadas o "madre".
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta.</i>
Thy-1	<i>Thy-1 membrane glycoprotein.</i>
TP53	<i>Tumor Protein P53.</i>
uPA	<i>Urokinase-type plasminogen activator.</i>
VEGF / VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor/ Vascular endothelial growth factor Receptor.</i>
Wnt	<i>Wnt signaling pathways.</i>
Wt	<i>Wild type.</i>
ZEB	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox.</i>



Resumen / Summary.

1. RESUMEN.

TÍTULO: "Cambios proteómicos y del metabolismo energético en un modelo *in vitro* de interacción epitelio-mesenquimal de cáncer de páncreas"

INTRODUCCIÓN: El adenocarcinoma ductal de páncreas es un tumor con una gran capacidad de invasión y metástasis. La transición epitelio mesenquimal (EMT) es un conjunto de procesos por los que la célula tumoral incrementa dicha capacidad, que son reversibles y están asociados con mecanismos epigenéticos y de disregulación metabólica, que a su vez tienen efectos transitorios en la transcripción génica.

Los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) son el componente celular más abundante del estroma tumoral y colaboran en la promoción del tumor primario y en la generación del nicho metastásico.

El cáncer de páncreas se asocia a una gran reacción desmoplásica, caracterizada por proliferación fibroblástica y secreción de matriz extracelular, que puede constituir hasta el 70% del volumen tumoral. El TGF- β está implicado en la activación de las células estromales del cáncer de páncreas y en la de los procesos de transición epitelio-mesenquimal de las células tumorales. Paradójicamente, la inactivación de SMAD4, frecuente en cáncer de páncreas, que impide la señalización por TGF- β , se asocia a un incremento de la capacidad de metástasis.

HIPÓTESIS: 1. Los co-cultivos con célula tumoral y célula estromal representan un modelo experimental eficiente, válido para generar hipótesis biológicas, identificar dianas farmacológicas y ensayar actividad de fármacos. 2. El co-cultivo de células tumorales epiteliales con fibroblastos puede inducir una transformación de ambos tipos celulares que remede una EMT. 3. El estudio paralelo de dos modelos de cáncer de páncreas que difieran entre sí por su capacidad de transmitir la señal de TGF- β puede generar hipótesis sobre mecanismos alternativos

de adopción de fenotipos agresivos. 4. El modelo de co-cultivo estroma-tumor necesita alterar su programa de regulación del metabolismo energético para poder adquirir un fenotipo transformado más agresivo. 5. Los estudios proteómicos pueden permitir la identificación directa de cambios en la "abundancia" de proteínas implicadas en la transformación celular durante el co-cultivo estroma-tumor.

OBJETIVOS: 1.- Establecer modelos de co-cultivos reproducibles con líneas celulares tumorales y estromales humanas. 2.- Analizar si el co-cultivo modifica el fenotipo invasor de las células tumorales. 3.- Identificar cambios en el proteoma de las células tumorales y estromales, antes y después del crecimiento en co-cultivo. 4.- Identificar cambios en la expresión por ambas estirpes celulares, de proteínas involucradas en el control del metabolismo energético, antes y después del crecimiento en co-cultivo. 5.- Postular hipótesis sobre dianas proteicas susceptibles de abordaje farmacológico.

MATERIALES Y MÉTODOS: Fases del estudio: 1. Establecimiento de co-cultivos; 2. Estudios de migración / invasión; 3. Modificaciones moleculares globales en fibroblastos y tumor; 4. Estudios de proteómica diferencial; 5. Estudios proteómicos relacionados con metabolismo energético. Se seleccionaron las líneas celulares Capan-1 (ATCC® HTB-79™), de cáncer de páncreas, con nula expresión de *SMAD4*; PL45 (ATCC® CRL-2558™), de cáncer de páncreas, sin alteraciones en *SMAD4*; LC5, fibroblastos de pulmón embrionario humano. Se produjo una línea estable LC5 que expresasen la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*), para permitir su separación de los co-cultivos mediante FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*). La proteómica se realizó mediante electroforesis bidimensional diferencial en gel (DIGE) y espectrometría de masas. Se realizó un análisis cuantitativo de proteínas del metabolismo energético mediante microarrays de proteínas de fase reversa.

RESULTADOS: Se generó una población de fibroblastos viables con un enriquecimiento de más del 90% en LC5-GFP⁺. Se generó un

procedimiento óptimo para establecer co-cultivos entre células tumorales y fibroblastos, alcanzando una confluencia final del 80% tras 72 h de su establecimiento y una *ratio* final células tumorales:fibroblastos de 20:80.

Los experimentos de migración e invasión mostraron activación de fibroblastos y de células tumorales, cuando crecen en condiciones de co-cultivo, con respecto a las de mono-cultivo. Desde el punto de vista molecular, a las 48-72 h de co-cultivo, los fibroblastos incrementan la expresión de α -SMA, se produce un incremento de secreción de FGF-7 (KGF) y en las células Capan-1 se observa una menor expresión de E-cadherina.

Los proteomas de las células estudiadas cambian en condiciones de co-cultivo, respecto a las de monocultivo: A) En la línea Capan 1 aumentó la cantidad relativa de Filamina B, HSP60, anexina A2 y 40S proteína ribosomal SA; se observa una disminución de α -actinina-4, Prelamina A/C y HSP β -1. B) En la línea PL45 se observó un incremento de la cantidad relativa de C-1-tetrahidrofolato sintetasa, Factor de elongación 2, ATPasa del Retículo endoplasmático de transición, Radixina, Proteína regulada por glucosa de 78 kDa, XRCC6, Proteína de estrés 70, Proteína Heat shock cognate 71 kDa, HSP70 1A/1B, Fosfoproteína 1 inducida por estrés, Complejo T, proteína 1, subunidad ϵ y HSP60. C) En la línea de Fibroblastos cultivados con Capan-1, se determinó un incremento de la abundancia de α -actinina-4, Tubulinas, Vimentina, y una disminución de Proteín-glutamina gamma-glutamyl-transferasa 2, Inhibidor de la elastasa leucocitaria, Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A. D) En la línea de Fibroblastos cultivados con PL45, se determinó un aumento de la cantidad relativa de Adenosil-homocisteinasa, Tubulina, Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa y de Anexina A1; se detectó una disminución de Peróxido-reductasa mitocondrial, dependiente de tiorredoxina y de Peptidil-prolil cis-trans isomerasa B.

El análisis KEGG detectó un enriquecimiento de las proteínas identificadas en las vías moleculares de: Enfermedad de priones ($p=0.0001$);

Procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico ($p=0.0002$); Miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho ($p=0.0004$); Procesamiento y presentación de antígenos ($p=0.0004$); Adhesión focal ($p=0.0043$); Regulación del citoesqueleto de actina ($p=0.0046$); Degradación de RNA ($p=0.0075$); Unión adherente ($p=0.0075$); Miocardiopatía hipertrófica ($p=0.0086$). En la línea de fibroblastos LC5, se identificó que la vía de las uniones gap mostró un enriquecimiento en las proteínas identificadas en los experimentos de proteómica diferencial.

Desde el punto de vista del metabolismo energético, en la línea Capan-1, en condiciones de co-cultivo, aumentan su expresión las proteínas pertenecientes a la fosforilación oxidativa (NDUFS3, SDHB, CORE2 y COXII), la proteína antioxidante SOD2, la proteína mitocondrial HSP60; y la proteína G6PDH (ruta de las pentosas fosfato); la expresión de la proteína glicolítica PKM2 disminuye. Los fibroblastos LC5, en co-cultivo con Capan-1, aumentan la expresión de la proteína de la fosforilación oxidativa SDHB, y disminuyen la de PKM2 (glicólisis). En PL45 sólo se detectó incremento de la expresión de HADHA, (β -oxidación de lípidos). En cambio, la línea de fibroblastos LC5 en co-cultivo con PL45, presentó una disminución de PKM2 y LDHA (glicólisis), de IF1 (fosforilación oxidativa), de PDHe (metabolismo mitocondrial) y de la proteína estructural de la mitocondria HSP60.

CONCLUSIONES: 1. El co-cultivo de células tumorales de cáncer de páncreas con fibroblastos humanos es viable y representa un modelo experimental eficiente y válido para generar hipótesis biológicas. 2. El co-cultivo induce un incremento precoz de la capacidad de migración de las células tumorales y de los fibroblastos, que se correlaciona con la expresión de marcadores de EMT y de transformación a miofibroblastos, respectivamente. 3. En la línea Capan-1, el análisis KEGG indica que las proteínas que disminuyen participan en uniones entre células epiteliales, mientras que se incrementan las relacionadas con migración e invasión, lo cual habla a favor de la adquisición de un fenotipo menos epitelial. Así

mismo destaca el incremento de la proteína de estrés térmico HSP60, que sugiere la necesidad de mantener la funcionalidad de proteínas críticas sometidas a modificaciones secundarias al metabolismo celular. 4. PL45, la línea sin mutación en SMAD, adquiere unos cambios muy diferentes: algunos son consecuencia de la activación de SMAD por TGF- β ; otros reflejan una adaptación de la célula para sintetizar proteínas, mantenerlas funcionales, o eliminarlas/extruir las. También destaca que la célula se adapte a una situación de daño de DNA y que precise un incremento de proteínas relacionadas con el metabolismo mono-carbonado. Esto último puede estar implicado en la disponibilidad de grupos metilo tanto para la síntesis de nucleótidos y de aminoácidos, como para la regulación epigenética de la expresión génica. Algunos cambios apoyan la transición a un fenotipo migratorio. Dado el aumento de proteínas relacionadas con el tráfico de moléculas mediado por retículo endoplasmático, es posible que esta célula incremente la producción de exosomas, que podrían comportarse como elementos de “comunicación” intercelular con los fibroblastos. 5. De forma global, los fibroblastos incrementan la cantidad de tubulinas y de anexinas, que están implicadas en varios procesos como el de la endocitosis de fagosomas o el establecimiento de uniones gap. Uno y otro pueden ser mecanismos por los cuales se facilita la entrada de moléculas del medio intercelular que contengan moléculas liberadas por las células epiteliales. 6. Desde el punto de vista bioenergético destaca una mayor abundancia relativa de varias proteínas de la fosforilación oxidativa, en la línea Capan-1. La línea PL45 sufre menos variación en este sentido que la Capan-1. Los fibroblastos cultivados en presencia de PL45 disminuyen su expresión de PKM2 y LDHA. Esta variación en PKM2 supone una disminución de la conversión del piruvato al lactato, lo cual va en contra de que en este modelo las células transiten a un fenotipo “glicolítico”. 7. Desde un punto de vista terapéutico merecería la pena investigar el papel de anexina A2 y de HSP 60 como dianas de este proceso de interacción precoz epitelio-mesenquimal.

2. SUMMARY.

TITLE: “Modifications in the Proteome and Energy Metabolism in an *in vitro* Pancreatic Cancer Model of Epithelial-Mesenchymal Interaction”

INTRODUCTION: Ductal adenocarcinoma is a tumour with a great potential to invade tissues and metastasize. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a set of reversible processes that confers tumor cell a greater ability to migrate and develop distant metastases. EMT is associated with epigenetic mechanisms and metabolic dysregulation, which have transient effects in gene transcription.

Cancer associated fibroblasts (CAF) are the most frequent cell type in tumor stroma, that cooperate with the tumor in cancer promotion and in conditioning the metastatic niche.

Pancreatic cancer is associated with a great desmoplastic reaction. This is characterized by fibroblasts proliferation and extracellular matrix generation, and can constitute 70% of the tumour volume. TGF- β is involved in the activation of both stromal cells and EMT processes in tumor cells. However, SMAD4, a member of TGF- β signaling pathway, is frequently inactivated in pancreas adenocarcinoma. Nevertheless, this fact is associated to an increase of its metastatic behaviour.

HYPOTHESES: 1.-Tumor-stromal co-culture might become an efficient experimental model that enables the generation of biological hypothesis, the identification of new pharmacological targets or the assessment of new anticancer drugs. 2.-Co-cultures of epithelial tumor cells and fibroblasts might induce the transformation of both cell types that resembles the biological processes of the EMT. 3.-The study of two models that differ in their ability to stimulate the canonical TGF- β pathway might identify alternative mechanisms to promote a more aggressive malignant phenotype. 4.-This tumor-stromal co-culture model might require a

metabolic reprogramming to enable the transition to a more aggressive phenotype. 5.-Proteomics might capture and identify changes in the abundance of proteins that might be involved in this malignant progression of tumor cells.

OBJECTIVES: 1.-To establish reproducible co-culture models with human tumor cell lines and human stromal cell lines. 2.-To analyze if co-culture modifies the aggressive phenotype of tumor cells. 3.-To identify changes in the proteome of tumor cells and stromal cells. 4.-To identify changes in the expression of proteins responsible for energy metabolism. 5.-To generate hypotheses on new druggable targets.

MATERIALS & METHODS: The study underwent through the following phases: 1. Setting up co-cultures; 2. Cell Migration / cell invasion studies. 3. Overall molecular modifications in fibroblasts and tumor; 4. Differential Proteomics. 5. Energy metabolism oriented proteomics (protein arrays).

The following cell lines were selected: Capan-1 (ATCC® HTB-79™), human pancreatic cancer, *SMAD4* null; PL45 (ATCC® CRL-2558™), human pancreatic cancer, wt *SMAD*; and LC5, human embryonic lung fibroblasts.

We generated a stable LC5 cell line expressing GFP (*Green Fluorescent Protein*), to allow cell sorting (*Fluorescence Activated Cell Sorting*).

Proteomics was approached by bidimensional differential in gel electrophoresis (DIGE) and mass spectrometry. A reverse phase protein microarray was used to quantify selected proteins involved in energy metabolism.

RESULTS: An enriched population (i.e. > 90%) of viable fibroblasts expressing GFP was produced. The optimal method to establish co-cultures with tumor cells and fibroblasts was defined, achieving a final confluence of 80% and a tumor:fibroblast ratio of 20:80 after 72 h.

Cell migration and invasion assays demonstrated that both tumor cells and fibroblasts were activated in co-culture respect to mono-culture conditions.

From a molecular perspective, 48-72 h of co-culture increased the expression of α -SMA in fibroblasts, as well as the secretion of FGF-7 (KGF), and decreased the expression of E-cadherin in Capan-1 cells.

Co-cultures modified cell proteomes, respect to monocultures: A) Capan 1: increased abundance of Filamin B, HSP60, Annexin A2 and 40S ribosomal protein SA; decreased abundance of α -actinin-4, Prelamin A/C and HSP β -1. B) PL45: increased abundance of C-1-tetrahydrofolate synthetase, Elongation Factor 2, ATPase Transition Endoplasmic Reticulum, Radixin, 78 KDa Glucose Regulated Protein, XRCC6, 70 Stress Protein, Heat shock cognate 71 kDa protein, HSP70 1A/1B, Stress-induced Phosphoprotein-1,T Complex, protein 1 subunit ϵ , and HSP60. C) Fibroblasts cultured with Capan-1: increased the abundance of α -actinin-4, Tubulins, Vimentin, and decreases Protein-glutamin gamma-glutamyl-transferase 2, leucocyte elastase inhibitor, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A. D) Fibroblasts cultured with PL45: increased the abundance of Adenosyl-homocysteinase, Tubulins, Glucose-6-Phosphate 1-dehydrogenase and Annexin A1; a decrease in Peroxide-reductase mitochondrial, thioredoxin dependent, and Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa B was observed.

KEGG analyses in tumor cell lines showed that the following pathways were enriched in at least two of the identified proteins: Prion diseases ($p=0.0001$); Protein processing in endoplasmic reticulum ($p\text{-valor} = 0.0002$); Arrhythmogenic right ventricle cardiomyopathy ($p=0.0004$); Antigen processing and presentation ($p = 0.0004$); Focal adhesion ($p = 0.0043$); Actin cytoskeleton reorganization ($p = 0.0046$); RNA degradation ($p = 0.0075$); adherens union ($p = 0.0075$); Hypertrophic cardiomyopathy ($p=0.0086$). In fibroblasts, the analyses showed that the gap union pathway was enriched in the identified proteins.

From the energy metabolism perspective, Capan-1, after co-culture with fibroblasts, increased several proteins belonging to OXPHOS (NDUFS3, SDHB, CORE2 y COXII), the antioxidant SOD2, the mitochondrial HSP60; and G6PDH (phosphate pentoses pathway). The expression of the

glycolytic PKM2 decreased. Their fibroblasts partners increased the expression of SDHB and also decreased PKM2.

PL45 experimented less changes in these proteins (only an increase in HADHA - fatty acid β -oxidation was detected). Their fibroblasts partners showed a decrease in PKM2 and LDHA; IF1 (OXPHOS), PDHe and HSP60.

CONCLUSIONS. Co-culture models with human pancreatic cancer cells and fibroblasts are feasible and represent an efficient model to generate biological hypotheses.

Co-cultures induce an activation of cell migration, both in tumor cells and fibroblasts. This is associated with the acquisition of molecular markers of EMT and miofibroblasts, respectively.

In Capan-1 cell line, KEGG analyses showed that the identified proteins that become less abundant after co-culture are involved in epithelial cell unions, whereas those which become more abundant are involved in migration and invasion pathways, supporting the transition to a mesenchimal phenotype. A substantial increase in HSP60 suggest the need for repairing protein misfoldings, maybe as a consequence of an increase in cell OXPHOS.

Regarding PL45, the wt SMAD pancreatic cancer cell line, the proteomic modifications are quite different. Some of these changes are known to be consequences of SMADs activation, suggesting TGF- β signaling. Others are reflecting a functional adaptation to protein anabolism, protein chaperone activities or protein degradation and extrusion. Some proteins with increased expression are associated with DNA repair activities or monocarbonate metabolism. The latter might be involved in the availability of the methyl radicals for either nucleotide synthesis, aminoacid synthesis or DNA methylation. Some other changes support the transition to a migratory phenotype. The increase in the expression of proteins that control intracellular transportation of molecules coupled to

endoplasmic reticulum suggest that this cells might also increase the number of exosomes released to the extracellular medium, which could participate in tumor-fibroblast communications.

Overall, fibroblasts increase the abundance of tubulins and Annexin A1, involved in interesting processes such as fagosome endocytosis and gap unions. They both can be means to interact with tumor cells.

From the point of view of energy metabolism, Capan-1 cell line increased the expression of several proteins belonging to the OXPHOS system. This behaviour is not followed by PL45 cells. In addition, their fibroblast partners decreased the expression of PKM2 and LDHA. All together, these results are against the hypothesis of a “glycolitic switch”.

From a therapeutic perspective, it could be interesting to explore the potential of Annexin A2 and HSP 60 as drug targets, in an attempt to disrupt tumor-fibroblast interactions that promote the acquisition of a more aggressive cancer phenotype.



Introducción.

3. INTRODUCCIÓN.

El presente proyecto surge de la necesidad de producir modelos biológicos relevantes y factibles, para estudiar nuevas dianas terapéuticas, nuevos tratamientos antineoplásicos, nuevos marcadores de respuesta o posibles mecanismos de resistencia, en el laboratorio del grupo de Oncología Traslacional del Instituto de Investigación “Hospital 12 de Octubre”(2). La finalidad global del proyecto es conocer la viabilidad y relevancia biológica de un modelo *in vitro* de co-cultivo estroma-tumor y evaluar la posibilidad de que dicho modelo identifique proteínas diana para manipulación farmacológica con intención antineoplásica. El tumor elegido inicialmente fue el adenocarcinoma ductal de páncreas, por representar una enfermedad en la que los tratamientos actualmente empleados tienen una eficacia subóptima.

3.1. El cáncer de páncreas es una enfermedad genética compleja, de mal pronóstico.

Las últimas décadas han supuesto una revolución cualitativa y cuantitativa en el conocimiento de la biología de la célula tumoral. Ello ha permitido también la identificación o caracterización molecular de dianas moleculares de interés terapéutico, lo que a su vez ha tenido como consecuencia el desarrollo de numerosos compuestos experimentales dirigidos contra dichas dianas.

Esta revolución no ha conseguido por igual efectos favorables sobre el pronóstico de todos los pacientes con cáncer. En el caso concreto del adenocarcinoma ductal de páncreas (en adelante cáncer de páncreas), la proporción de pacientes que sobreviven 5 o más años apenas supera el 7% (3).

Es este un tumor que supone casi 50000 nuevos casos anuales en los Estados Unidos de América (3, 4), la mayoría de los cuales fallecerá antes de los 2 años del diagnóstico. Mundialmente, el cáncer de páncreas es la octava causa de muerte por cáncer en varones (138100 fallecimientos/año) y la novena en mujeres (127900 fallecimientos anuales)(5). En nuestro país la tasa de mortalidad ajustada en el periodo 2003-2007 fue de 9.8 casos anuales por cada 100000 varones y de 6 por 100000 mujeres (6).

Las razones para la alta mortalidad de este tumor son varias. En primer lugar, actualmente es una enfermedad cuyo tratamiento radica fundamentalmente en la cirugía, porque el resto de las terapias son sólo marginalmente efectivas. Pero a la vez, es una enfermedad que sólo en el 9% de los casos se diagnostica en una etapa confinada al páncreas. Aun así, sólo el 27% de los pacientes en esas condiciones excepcionales sobreviven más de 5 años (3). Es decir, que las causas de tan elevada mortalidad no se deben sólo a un diagnóstico tardío, como consecuencia de la inespecificidad de sus síntomas y la localización anatómica de la enfermedad. Este tumor tiene una tendencia biológica a la invasión loco-regional y diseminación metastásica.

El cáncer de páncreas se establece tras una secuencia de alteraciones moleculares por las que las células epiteliales adquieren al menos una de las siguientes anomalías genéticas (7-9): el 90% de los pacientes tienen tumores con mutaciones en el oncogén *KRAS*, lo que se traduce en la expresión de una proteína RAS funcionalmente activada, que a su vez induce una estimulación aberrante de las señales de proliferación y supervivencia celulares; un 95% de los tumores tienen inactivación del gen *CDKN2A*, lo que genera una pérdida de la proteína p16 (un regulador de la transición G1-S del ciclo celular) y un incremento en la proliferación celular; el gen *TP53* es anormal en el 50-75% de los tumores, lo que permite que las células puedan acumular anomalías genéticas sin que se activen mecanismos de reparación de DNA o de apoptosis;

finalmente, el gen *DPC4* (gen deletado en cáncer de páncreas), también denominado *SMAD4/MADH4*, está inactivo en el 50% de los casos, lo que genera una alteración de la señalización de TGF- β (Factor transformante de crecimiento) y mayor potencial metastatizante.

Pero el cáncer de páncreas es una enfermedad genéticamente aún más compleja y heterogénea que lo que se deduce de lo anteriormente expuesto. En un estudio que secuenció los exomas de 24 muestras de cáncer de páncreas, se describió una media de 63 anomalías genéticas relevantes por tumor, que podrían ser organizadas en 12 grupos funcionales de vías moleculares (10).

Una característica del cáncer de páncreas es la reacción desmoplásica o formación de un estroma peritumoral denso (11, 12). En esta respuesta estromal juegan un papel importante las células pancreáticas estrelladas, células con fenotipo miofibroblástico. Tras su activación por factores como TGF- β , PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y FGF (factor de crecimiento fibroblástico), estas células secretan colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. Así mismo, producen metaloproteinasas, lo cual regula la formación y resorción del estroma. También son responsables de la pobre vascularización del estroma tumoral. Este entorno peritumoral resultante, además de suponer una barrera mecánica para acceder al tumor desde el punto de vista farmacológico, promueve una disregulación metabólica y una respuesta inmunosupresora local así como la viabilidad de células *stem* tumorales, todo lo cual facilita la progresión del tumor y la diseminación metastásica (11-13).

Las células estromales expresan múltiples proteínas involucradas en una mayor agresividad biológica, resistencia a fármacos y peor supervivencia. Entre ellas destacan Cox-2, PDGFR, factores VEGF, factor derivado del estroma (SDF), quimioquinas, integrinas, SPARC (proteína ácida secretada rica en cisteína) y elementos de la vía de Hedgehog.

3.2. La transición epitelio-mesenquimal promueve la diseminación del tumor.

La transición epitelio-mesenquimal es un fenómeno de las células de importancia cardinal en fisiología (desarrollo embrionario, reparación tisular) y en patología. Se describió inicialmente en la década de 1980, en embriones de pollo, como mecanismo que permite procesos como la gastrulación, el desarrollo de la cresta neural, la disociación de los somitas y la fusión de los arcos branquiales (14, 15). Del mismo modo existe una transición endotelio-mesenquimal, que permite la formación de las válvulas y de los septos cardíacos, por ejemplo (15). En el adulto, estos mecanismos de control del desarrollo celular tienen importancia en los procesos de reparación de daño tisular y en enfermedades como fibrosis o el cáncer.

Las células epiteliales se unen entre sí a través de moléculas de adhesión, como las claudinas y la E-cadherina y forman capas polarizadas que se unen a la membrana basal (16). Mantienen una polaridad ápico-basal a través de las conexiones entre filamentos intermedios y hemidesmosomas. La adhesión intercelular es crítica para mantener el fenotipo epitelial. Durante la transición epitelio-mesenquimal las células pierden estas características, ganando un fenotipo mesenquimal que les permite la migración y la invasión, que les faculta la diseminación metastásica (17).

Entre los hechos que caracterizan este estado celular destacan la pérdida de expresión de E-cadherina, la reducción de la abundancia de las proteínas de las uniones estrechas (tales como ZO-1 (*zona occludens* 1) y la ocludina) y citoqueratinas, y un incremento de la abundancia de marcadores mesenquimales, como la vimentina, la fibronectina, la FSP-1 (proteína específica de fibroblasto-1), la α -actina de músculo liso (α -SMA) y la N-cadherina (18). La pérdida de adhesión intercelular desencadena un cambio en la composición y disposición del citoesqueleto y una consiguiente alteración de la morfología celular, que pasa a ser

cuboidea con polaridad ápico-basal, a fusiforme con polaridad antero-posterior (Figura 1). Estas nuevas células están capacitadas para migrar en los tejidos, junto con una matriz de fibronectina secretada por ellas (18).

Por lo tanto, el fenotipo mesenquimal de la transición epitelio-mesenquimal se caracteriza por adoptar una serie de cambios morfo-funcionales, como la pérdida de uniones célula-célula, la pérdida de polaridad apical-basal, la degradación de la membrana basal, la reorganización del citoesqueleto y una capacidad de migrar e invadir tejidos (Figura 1).

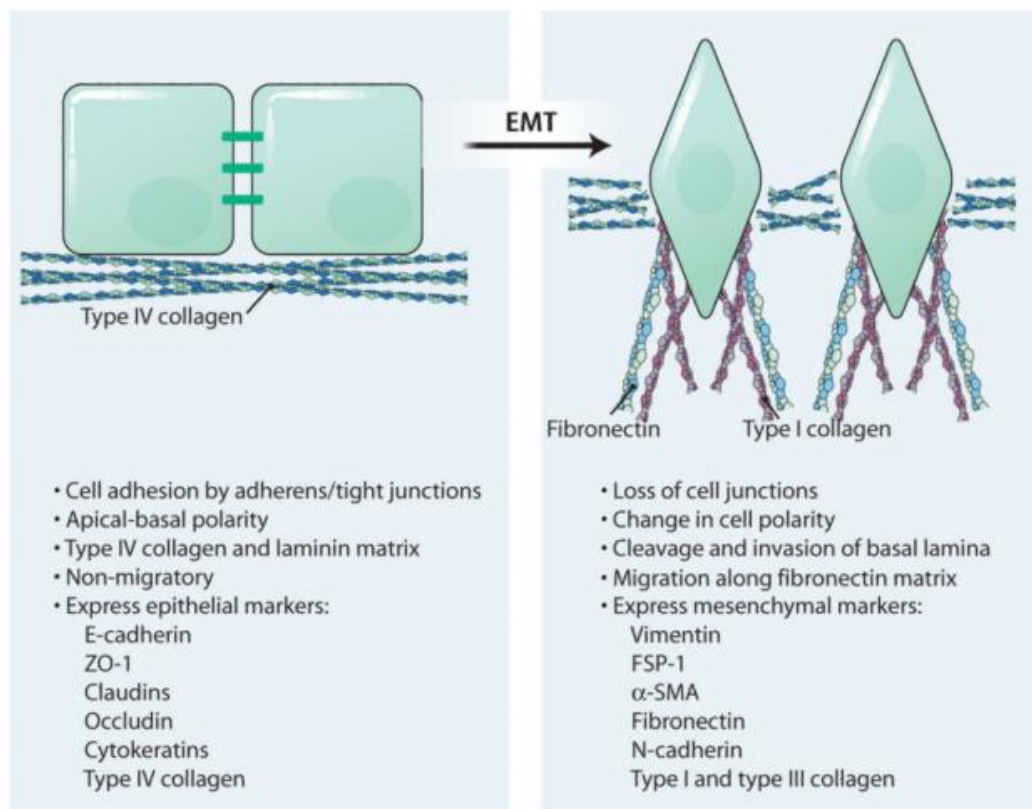


FIGURA 1. CAMBIOS CELULARES ASOCIADOS A LA EMT (15)*.

* (Figura obtenida de Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. Sci Signal. 2014;7(344):re8)

La expresión y activación de los factores de transcripción que inducen la EMT pueden ocurrir como respuesta a varios estímulos. Entre ellos destacan los mediados por TGF- β , BMO (proteína morfogénica del hueso), EGF (factor de crecimiento epidérmico), FGF, PDGF, Wnt, Shh (*Sonic Hedgehog*) y por integrinas (15). De todos ellos, es el TGF- β el que más ha acaparado la atención de los investigadores, por su papel crucial en desarrollo embrionario, fibrosis y progresión tumoral. Todos estos estímulos pueden generar señales que llegan al núcleo celular a través de kinasas intracelulares, y acaban induciendo la activación de la transcripción de los genes del proceso EMT. La EMT no es un fenómeno binario de “todo o nada”. La reprogramación es flexible y dinámica, está condicionada por el microambiente, la estirpe y el estado de la célula implicada (19).

La capacidad del TGF- β para inducir la EMT se describió por primera vez *in vitro*, en cultivos celulares. Tras exposición a este factor, las células epiteliales cambiaron de un aspecto cuboidal a fusocelular, a la vez que perdían la expresión de marcadores epiteliales e incrementaban la de marcadores mesenquimales como fibronectina o vimentina. Estos cambios se acompañaron de un incremento en la motilidad celular (20).

El TGF- β induce la dimerización de receptores de membrana, que promueven la fosforilación de SMAD2/3. Posteriormente, fosfo-SMAD2/3 forma un complejo trimérico con SMAD4, que se transporta al núcleo (2). Este complejo colaborador se regula negativamente por SMAD6 y SMAD7. Si predomina la señal positiva, se incrementará la transcripción génica de varias familias de activadores de transcripción, Snail (SNAIL), ZEB (*Zinc Finger E-Box Binding Homeobox*) y bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*), que inician una reprogramación genética que tiene como efectos la pérdida de las características epiteliales y la ganancia de las mesenquimales, resumidas en la Figura 2. Los procesos que conforman la EMT son reversibles, esto es, las células pueden recuperar el fenotipo

epitelial. Esta habilidad es crítica en el proceso de diseminación metastásica a distancia.

El estado epitelial es la situación morfo-funcional por defecto de la célula epitelial. La habilidad para adquirir un fenotipo mesenquimal estable depende de la presencia de señales promotoras de la EMT que vengan del microambiente circundante. Es muy probable que condiciones microambientales anormales como la hipoxia, acidez o privación de nutrientes, puedan generar una serie de respuestas en las células tumorales, como la adaptación metabólica, alteraciones epigenéticas y alteraciones fenotípicas asociadas a la EMT (21).

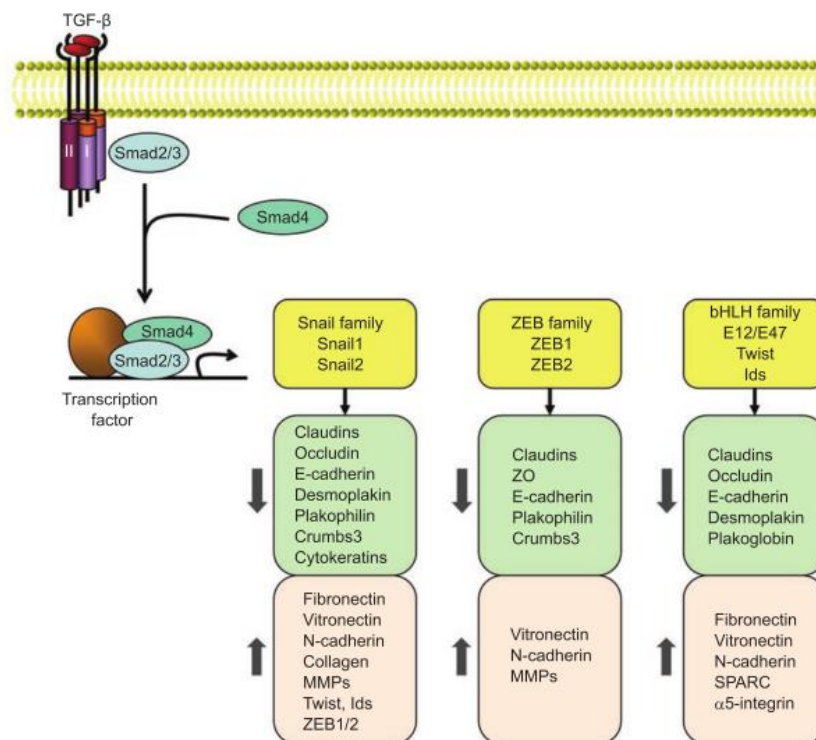


FIGURA 2. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA EMT POR TGF-β (22)*.

*(Figura obtenida de Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. Cell Res. 2009;19(2):156-72.

3.3. El estroma estimula y regula la EMT del tumor.

El fenotipo epitelial es el estado por defecto de las células epiteliales. La habilidad de adquirir un fenotipo mesenquimal estable depende de la presencia sostenida de señales promotoras de la EMT (23). Posiblemente estas señales se originan y regulan por el microambiente tumoral o la hipoxia y no por alteraciones genéticas permanentes del tumor. De hecho, es cada vez más evidente que la naturaleza reversible de la EMT está asociada con mecanismos epigenéticos reversibles, que a su vez tienen efectos transitorios en el programa de transcripción génica (23). Estos cambios en los patrones de expresión génica están mediados por la metilación de DNA de dinucleótidos CpG, así como otras modificaciones covalentes post-transcripcionales de las proteínas histonas, que incluyen su acetilación, metilación, biotinización y fosforilación (24). Dado que la mayoría de los enzimas responsables de añadir o suprimir la etiqueta epigenética requieren sustratos o cofactores que son metabolitos intermediarios de la célula y capaces de difundir a través de los poros nucleares (acetil CoA, NAD⁺, SAM, α KG, FAD) (25, 26), no es difícil imaginar que la fluctuación de los niveles de metabolitos pueda modular las actividades de las enzimas que regulan el estado de la cromatina. Evidencias recientes han confirmado que la disponibilidad de estos metabolitos inducen modificaciones epigenéticas, lo que proporciona una conexión directa entre cambios nutricionales, respuesta metabólica y expresión génica (21).

La disregulación metabólica es una característica esencial del cáncer y desempeña un papel esencial durante el desarrollo y en células *stem* del cáncer (13). El estado metabólico mejor caracterizado en las células tumorales es el secundario al denominado efecto Warburg. Este consiste en una disminución del peso de la fosforilación oxidativa como ruta metabólica principal para la obtención de energía. Esto implica que, incluso en condiciones de aerobiosis, el ATP de la célula tumoral se

obtiene de la conversión de la glucosa a lactato (27). Esto no es la consecuencia de un defecto mitocondrial en la maquinaria de fosforilación oxidativa, como inicialmente postuló Warburg (27). La célula tumoral necesita gran disponibilidad de moléculas sencillas para síntesis de lípidos, nucleótidos y aminoácidos. De otro modo, no podría satisfacer su ritmo de crecimiento y proliferación. En otras palabras, estas células no sólo necesitan ATP. La glicolisis aerobia les proporciona una ventaja: disponibilidad flexible de los átomos de carbono de la glucosa para cualquiera de las rutas biosintéticas subsidiarias (28). Algunas evidencias recientes también ponen de manifiesto que la glicolisis aeróbica minimiza la producción de especies reactivas de oxígeno (21).

En un modelo metabólico revisado ("post-Warburg"), se postula que se necesita un flujo glicolítico elevado para mantener la proliferación celular, sea la normal o la neoplásica. En el estado de diferenciación celular post-mitótica, la importancia de la glicolisis es menor y se incrementa la fosforilación oxidativa (29). Por lo tanto, es de suponer que lo mismo ocurra en la EMT.

La producción por el estroma y por el tumor de factores de crecimiento (p.e. HGF, EGF, FGF) activa y mantiene de manera autocrina y paracrina la EMT. La función primaria de estos factores es la de activar vías de señalización oncogénica, como Ras y PI3K. El papel clásico de estas vías es la regulación del ciclo celular, el mantenimiento de la proliferación y la evasión de señales supresoras o de apoptosis. En la actualidad se piensa que la reprogramación metabólica es también un efecto primario de las alteraciones genéticas de la célula tumoral que afectan estas vías, y no sólo el resultado de una adaptación metabólica al incremento proliferativo (30).

Hay condiciones microambientales, como la hipoxia, la acidez y la disminución de glucosa, que pueden inducir la EMT y los cambios metabólicos asociados. De ellos, la hipoxia es el mejor estudiado. Esta condición puede estimular HIF1 (factor inducible por hipoxia), que es uno

de los promotores de progresión tumoral y metástasis más importantes. HIF1 también puede ser estimulado en condiciones normóxicas por vías oncogénicas, como la de PI3K (31) y por mutaciones en proteínas como succinato deshidrogenasa y fumarato hidratasa (32, 33). Una vez activado, HIF1 incrementa la transcripción de genes que codifican proteínas transportadoras de glucosa y la mayoría de las enzimas glicolíticas. Esto cambia la ruta metabólica de producción de energía y disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno de la cadena de transporte de electrones. Además, HIF1 activa las kinasas de la piruvato deshidrogenasa, lo que inactiva el complejo mitocondrial de la piruvato deshidrogenasa y reduce el flujo de piruvato derivado de glucosa al ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Esta reducción de piruvato disminuye la fosforilación oxidativa y el consumo de oxígeno, lo cual da más peso al fenotipo glicolítico y permite ahorrar oxígeno. Finalmente, la hipoxia también induce la EMT mediante la alteración epigenética de genes relacionados con la propia EMT (34).

3.4. En el estroma tumoral existen fibroblastos activados.

La hipótesis de “las semillas y la tierra” postula que hace falta un microambiente adecuado (la tierra) para que las células tumorales (las semillas) se desarrollen. En las últimas 4 décadas las investigaciones en cáncer se han centrado sobre todo en las células tumorales. Y como resultado de ello se han generado hipótesis biológicas, se ha realizado *screening* de antineoplásicos y se han buscado y definido nuevas dianas moleculares. Pero existen numerosas evidencias que indican que el estroma sobre el que se asienta el cáncer es algo más que el sustrato que le da soporte. Este estroma desempeña un papel activo en la iniciación, desarrollo y progresión de la mayoría de los tumores sólidos, incluso modificando el pronóstico de los mismos (35).

Entre las células del estroma se encuentran las del sistema inmune, los fibroblastos y miofibroblastos, células de los vasos sanguíneos, y otras células mesenquimales.

Los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) son el componente celular más abundante. Son un conjunto heterogéneo de fibroblastos, activados y no activados, que colaboran con el proceso neoplásico, tanto en la promoción del tumor primario como en la generación del nicho metastásico (36, 37). Los mecanismos para que ello ocurra no sólo son consecuencia directa de cambios inducidos en el tumor tras el contacto con el fibroblasto, sino que pueden implicar otros procesos extrínsecos a la célula tumoral, como la promoción de la angiogénesis, el remodelado de la matriz extracelular y la inflamación asociada al tumor (38).

3.4.1. Origen de los CAFs.

No está del todo aclarado cuál es la célula de origen de los CAF. Los estudios realizados hasta la fecha indican que los CAF pueden desarrollarse a partir de varias estirpes celulares:

- Los fibroblastos residentes en el tejido en el que asienta el tumor. Los análisis de los CAFs de metástasis hepáticas de cáncer de colon muestran que los CAFs expresan un fenotipo vimentina⁺, α SMA⁺ (actina- α de músculo liso), Thy-1⁺ similar al de los fibroblastos hepáticos (39). Otros autores sugieren que los fibroblastos senescentes promueven la transformación maligna y co-dirigen la progresión del tumor (40).
- Algunos estudios sugieren que son las células *stem* mesenquimales de la médula ósea, que pueden viajar hasta el estroma del tumor, las que promueven esta progresión (41). Recientemente se ha podido demostrar que estas células pueden incrementar la expresión de vimentina y α -SMA cuando son cultivadas con medio condicionado (secretoma) del cultivo de un tumor epitelial (41,

42). Se postula incluso que la célula tumoral media esta transformación secretando Notch, lo cual activa la vía de señalización TGF- β /SMAD en las células *stem* mesenquimales de la médula ósea (41).

- También pueden generarse CAFs a partir de células diferenciadas, mediante la activación de procesos EMT (transición epitelio-mesenquimal) o EndMT (transición endotelio-mesenquimal) (43, 44). El TGF- β es un inductor potente de estos procesos. Un estudio mostró que una subpoblación de CAFs α -SMA⁺ exhibía las mismas aberraciones genéticas que las células epiteliales neoplásicas vecinas, con una pérdida de expresión de citoqueratinas y una ganancia en vimentina y Thy-1 (45). Esto sugería que estos CAFs eran un estado de transición mesenquimal de una célula epitelial neoplásica. Otros investigadores mostraron que células endoteliales proliferantes podían sufrir una transición mesenquimal similar hacia CAF, perdiendo la expresión de CD31 y activando la de FSP-1 (proteína específica de fibroblastos) (43).
- Finalmente, diversas células mesenquimales pueden trans-diferenciarse hacia CAF. En este sentido hay evidencias que indican que el adipocito puede evolucionar hacia fibroblastos que pueden activarse por tumor, mostrando alta expresión de fibronectina, colágeno de tipo I y FSP-1 (43). Se especula que las células de músculo liso perivasculares y los pericitos puedan migrar hacia el lecho del tumor y trans-diferenciarse hacia CAF, puesto que esto mismo lo hacen en los procesos reparativos de fibrosis (46, 47).

3.4.2. Marcadores de los CAFs.

Los fibroblastos normales expresan vimentina, desmina, colágeno de tipo I, fibronectina y prolil-4 hidroxilasa. Los CAFs incrementan específicamente la expresión de α -SMA, FSP-1 (S100A4), NG2, PDGFR α/β , FAP (proteína de

activación de fibroblastos), uPA, periostina, tenascina-C, paladina, podoplanina y péptido natriurético B. También hay evidencias de que la expresión de algunas moléculas está específicamente disminuida: caveolina-1 y laminina. Los marcadores epiteliales (queratinas) o endoteliales (CD31) desaparecen (38).

Para identificar los CAFs normalmente se usa una combinación de marcadores, que difiere según la subpoblación en estudio y la estirpe de la célula epitelial. No existe una combinación útil para todos los casos, aunque la asociación de la α -SMA con la detección de otra sustancia secretada por los CAFs que promueva el crecimiento del tumor es una aproximación utilizada por la mayoría de los investigadores.

3.5. La transición epitelio-mesenquimal en el cáncer de páncreas.

El cáncer de páncreas es un tumor que característicamente se asocia a una gran reacción desmoplásica, caracterizada por proliferación fibroblástica y secreción de matriz extracelular, que puede constituir hasta el 70% del volumen tumoral (48). Se postula que esta característica debe de asociarse a un incremento en el potencial de invasión local y a distancia de la célula tumoral, favoreciendo procesos de EMT.

Histopatológicamente la desmoplasia se caracteriza por haces densos de colágeno tipo I y III, asociados con fibroblastos, con pérdida de la integridad de la membrana basal e invasión de las células epiteliales malignas. Esto se asocia, además, a una vascularización anormal, con capilares hiperpermeables interconectados. La abundante matriz es la consecuencia del aumento de la expresión de factores de crecimiento, como el TGF- β , producidos por el estroma. Esto a su vez genera un estímulo autocrino y paracrino de señales oncogénicas que amplifican la proliferación tumoral.

No está claro cuáles son los eventos celulares o moleculares que inducen la desmoplasia en el cáncer de páncreas. Las células mesenquimales predominantes en el estroma del cáncer de páncreas son las células estrelladas del páncreas. Además de en el adenocarcinoma ductal de páncreas, también se han identificado tanto en el páncreas normal como en el afectado por pancreatitis crónica. Hay cada vez más datos que indican que las células estrelladas del páncreas, cuando sufren una activación para transformarse en miofibroblastos, producen componentes de la matriz extracelular, metaloproteinasas de la matriz (MMP) e inhibidores de las MMP, activando para ello la ruta de las MAPK (11). Probablemente son las máximas responsables de la reacción desmoplásica (49). Expresan desmina, nestina y moléculas de adhesión neuronales, como la proteína ácida fibrilar glial, α -SMA y acúmulos de grasa intracelular, lo que les diferencia de los fibroblastos. Estas células tienen la capacidad de trans-diferenciarse desde un fenotipo quiescente (que almacena lípidos y retinoides) a un fenotipo miofibroblástico activado. En cultivo, cambian continuamente. Entre los activadores de esta transformación se incluyen interleuquinas, como la IL1, IL6, y la IL8, el TNF- α , el PDGF, el TGF- β y las especies reactivas de oxígeno. A su vez, cuando se activan producen PDGF, TGF- β , citoquinas, moléculas proinflamatorias (COX2) y la activina A. Esta última produce incremento de colágeno I e inhibidores de MMP (11, 49-51).

Algunos estudios muestran que el microambiente tumoral promueve la progresión del fenotipo maligno del tumor a través de metaloproteinasas de matriz (MMP-3), matriptasa o integrinas, que, al generar modificaciones estructurales de una matriz extracelular densamente interrelacionada, activa sistemas proteicos de transmisión de señal (52, 53). Se piensa que las proteínas anormales de la matriz extracelular están implicadas en la adquisición de un fenotipo más agresivo y de quimiorresistencia.

El TGF- β está implicado en la activación tanto de las células estrelladas del cáncer de páncreas como en la de los procesos de transición epitelio-mesenquimal de las células tumorales. Pero, a su vez, SMAD4 está frecuentemente inactivado en el cáncer de páncreas, lo que impide la señalización normal de TGF- β (Figura 3). Sin embargo, este hecho no sólo no merma su capacidad metastatizante sino que incluso se asocia a un incremento de la misma.

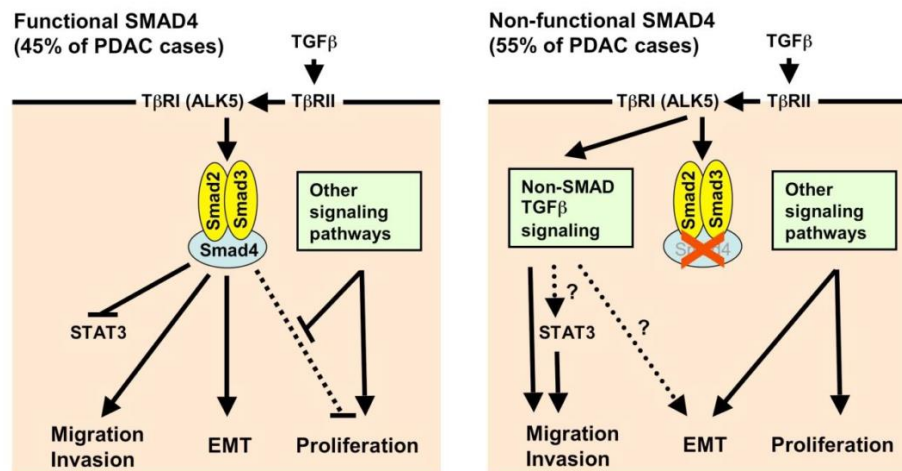


FIGURA 3. EFECTOS DIFERENCIALES DE TGF- β SEGÚN LA EXPRESIÓN DE SMAD4 (54).

Figura tomada de Maier HJ, Wirth T, Beug H. Epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2010;2(4):2058-83

En un modelo animal se ha comprobado que la delección homocigota de TGF- β suprime la inducción de EMT por TGF- β , pero no la probabilidad de metástasis. Se detectó un factor de transcripción regulado positivamente tanto en caso de presencia bialélica de SMAD4⁺ wt como en el de su delección homocigótica. Sin embargo la expresión de este factor estaba disminuida en delección heterocigótica de SMAD4. Los niveles de este factor se relacionaron con la capacidad metastatizante del tumor, independientemente de su capacidad para transformarse vía EMT, a un fenotipo mesenquimal. Este factor se identificó como RUNX3, que induce la expresión de proteínas como SPP1 y COL6A1, que estimulan la

migración celular y condicionan el nicho metastásico de manera diferente a la capacitación promovida por el proceso de la EMT (55).

Por lo tanto se postula que en el cáncer de páncreas existe una vía alternativa de diseminación a distancia que no implica necesariamente la activación de la EMT. El modelo de migración clásico se basa en la intravasación, diseminación y siembra de células aisladas en transición mesenquimal (56, 57). En la actualidad se piensa que debe existir otro mecanismo por el cual se intravasen grupos celulares tumorales, que aunque son mucho menos frecuentes que las células tumorales circulantes aisladas, tienen mayor capacidad de sobrevivir y de colonizar tejidos distantes. Se estima que en el cáncer de páncreas, un 6% de las células tumorales circulantes son agregados celulares (55), bastante mayor que en otros tumores epiteliales.

Por lo tanto, el estudio de mecanismos de invasión y diseminación en modelos tumorales en los que TGF- β no pueda activar el sistema canónico de las proteínas SMAD cobra especial interés para el conocimiento de procesos biológicos alternativos y la identificación de posibles dianas terapéuticas en el carcinoma ductal de páncreas.

3.6. Proteómica.

La proteómica es el estudio y caracterización de todo el conjunto de proteínas expresadas de un genoma. Dicho conjunto de proteínas se denomina proteoma. El proteoma de una célula varía según el estado en el que se encuentre: una situación de estrés, el efecto de fármacos o de una hormona pueden modificarlo. Así, en cada momento y en cada tipo celular el perfil de proteínas expresadas será diferente. La proteómica es útil para estudiar estas diferencias (58).

Las técnicas de proteómica abordan el estudio de este conjunto de proteínas. La Proteómica permite identificar, categorizar y clasificar las

proteínas con respecto a su función y a las interacciones que establecen entre ellas. De este modo, se pueden caracterizar las redes funcionales que establecen las proteínas y su dinámica durante procesos fisiológicos y patológicos (58).

La proteómica se está aplicando en la identificación de nuevos marcadores para el diagnóstico de enfermedades, la identificación de nuevos fármacos, la determinación de proteínas involucradas en la patogenia de enfermedades y el análisis de procesos de transducción de señales.

Existen tres ramas en la proteómica que enfocan el estudio del proteoma de manera diferente (58):

- La proteómica de expresión se encarga del estudio de la abundancia relativa de las proteínas y de sus modificaciones postraduccionales.
- La proteómica estructural se encarga de la caracterización de la estructura tridimensional de las proteínas.
- La proteómica funcional se encarga de la localización y distribución subcelular de proteínas y de las interacciones que se producen entre las proteínas y otras moléculas con el fin de determinar su función.

Las aplicaciones de la proteómica son múltiples, pero actualmente se destacan las siguientes (58):

- Identificación de nuevos marcadores para el diagnóstico de enfermedades.
- Identificación de nuevas dianas farmacológicas.
- Determinación de mecanismos moleculares involucrados en la patogenia de enfermedades.
- Análisis de rutas de transducción de señales.

Las técnicas más usadas en proteómica se basan en la electroforesis y en la espectrometría de masas. Dependiendo del objetivo del estudio

podemos agrupar las técnicas de proteómica en los siguientes grupos (58):

- Técnicas empleadas para analizar globalmente el proteoma y separar sus proteínas.

Entre ellas cabe destacar la electroforesis bidimensional, DIGE (*Difference In Gel Electrophoresis*: electroforesis diferencial en gel), ICAT (*Isotope-Coded Affinity Tags*: marcaje isotópico diferencial) y MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*: tecnología de identificación de proteínas multidimensional).

- Técnicas usadas para analizar individualmente las proteínas.

Con este objetivo se utilizan distintos tipos de espectrometría de masas, como el MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization Time Of Flight*: desorción/ionización mediante láser asistida por matriz en "tiempo de vuelo"), SELDI-TOF-MS (*Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*: espectrometría de masas en "Tiempo de Vuelo" mediante desorción/ionización por láser de superficie), MS/MS (*Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry*: espectrometría de masas en tándem).

Con estas técnicas se obtiene la huella peptídica (*peptide mass fingerprint*). La huella peptídica es el conjunto de fragmentos peptídicos que se obtienen tras tratar una proteína concreta con una proteasa determinada. La huella peptídica es característica de cada proteína y depende de la enzima con la que se fragmente. Actualmente hay numerosas bases de datos que recogen las huellas peptídicas de multitud de proteínas conocidas. Estas bases de datos se pueden rastrear usando programas bioinformáticos para buscar la huella peptídica que corresponda con la huella peptídica de la proteína que se esté estudiando y por tanto poder identificarla.

- Técnicas que se usan para estudiar interacciones entre proteínas.

Entre ellas se incluyen los sistemas “*yeast two hybrids*” de alto rendimiento o y la técnica “*Phage Display*”. La técnica “*Phage Display*” permite averiguar con qué proteínas interacciona una proteína problema o sonda. Esta técnica consiste en la expresión en la superficie de un fago de las proteínas que se quieren analizar. La proteína problema o sonda se inmoviliza sobre un soporte o membrana de tal modo que los fagos que expresan las proteínas que se unen a la sonda quedan inmovilizados sobre el soporte. Estos fagos se pueden recuperar fácilmente de la membrana y pueden ser empleados para la expresión de la proteína en *Escherichia coli* y su posterior identificación.

El análisis y la interpretación de los datos obtenidos con las técnicas de proteómica descritas anteriormente, especialmente cuando se utilizan a gran escala, necesita herramientas bioinformáticas.



Hipótesis.

4. HIPÓTESIS.

Para optimizar el descubrimiento de dianas farmacológicas y de nuevos fármacos, es necesario disponer de modelos experimentales que superen en complejidad a los cultivos *in vitro* de líneas tumorales inmortalizadas, pero que no requieran complejidad tecnológica.

- **Los co-cultivos con célula tumoral y célula estromal representan un modelo experimental eficiente, válido para generar hipótesis biológicas, identificar dianas farmacológicas y ensayar actividad de fármacos.**

La interacción estroma-tumor estimula y regula *in vivo* la transición epitelio-mesenquimal. En los modelos *in vitro* de EMT, esta se induce añadiendo factores (TGF- β u otros) al medio de cultivo de las células tumorales.

- **El co-cultivo de células tumorales epiteliales con fibroblastos puede inducir una transformación de ambos tipos celulares que remede la EMT de una manera más representativa de la realidad biológica.**

El proceso de la metastatización del cáncer involucra fenómenos de transición epitelio mesénquima, en la que el TGF- β juega un papel regulador crítico.

- **El estudio paralelo de dos modelos de cáncer de páncreas que difieran entre sí por su capacidad de activar las proteínas de la vía TGF- β puede generar hipótesis sobre mecanismos alternativos de adopción de fenotipos agresivos.**

La transición epitelio-mesenquimal requiere unos cambios en la regulación metabólica necesarios para mantener el estado de diferenciación mesenquimal invasor.

- **El modelo de co-cultivo estroma-tumor objeto de estudio necesita alterar su programa de regulación del metabolismo energético para poder adquirir un fenotipo transformado más agresivo.**

El estudio de las modificaciones en los perfiles de expresión génica basados en mRNA no necesariamente conlleva la identificación de proteínas diferencialmente expresadas, debido a que no contempla otros fenómenos implicados en la síntesis de proteínas.

- **Los estudios proteómicos pueden permitir la identificación directa de cambios en la abundancia de proteínas implicadas en la transformación celular durante el co-cultivo estroma-tumor.**



Objetivos.

5. OBJETIVOS.

- 1.- Establecer modelos de co-cultivos reproducibles con líneas celulares tumorales y estromales humanas.
- 2.- Establecer si el co-cultivo modifica el fenotipo invasor de las células tumorales.
- 3.- Identificar cambios en el proteoma de las células tumorales y estromales, antes y después del crecimiento en co-cultivo.
- 4.- Identificar cambios en la expresión por ambas estirpes celulares, de proteínas involucradas en el control del metabolismo energético, antes y después del crecimiento en co-cultivo.
- 5.- Postular hipótesis sobre dianas proteicas susceptibles de abordaje farmacológico.



Materiales y Métodos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

La Tabla 1 resume las etapas en las que se ha dividido este proyecto. Seguiremos el mismo esquema para resumir los materiales y métodos empleados, así como los resultados obtenidos.

TABLA 1. ESQUEMA GENERAL DEL PROYECTO.

1. Establecimiento de co-cultivos	<ul style="list-style-type: none"> • Mono-cultivos. • Co-cultivos directos. • Cultivos con medio condicionado (secretoma). • Co-cultivos en cámaras Transwell.
2. Estudios de migración / invasión	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayos de cierre de herida. • Ensayos de invasión en cámaras con insertos. • Estudios en cámaras Transwell.
3. Modificaciones moleculares globales en fibroblastos y tumor.	
4. Estudios de proteómica diferencial	
5. Estudios proteómicos relacionados con metabolismo energético	

6.1. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS.

6.1.1. Líneas celulares y medios de cultivo.

El trabajo de investigación que aquí se presenta se ha llevado a cabo con dos líneas tumorales humanas de cáncer de páncreas y una línea embrionaria de fibroblastos humanos.

La línea tumoral de páncreas **Capan-1** (ATCC® HTB-79™) fue adquirida a LGC Promochem, SLU-ATCC (Barcelona, España)(59). Esta línea fue

aislada en 1974 por J Fogh a partir de una metástasis hepática de un hombre de raza caucásica de 40 años de edad con un adenocarcinoma de páncreas. Las células en cultivo presentan morfología epitelial en monocapa adherente. Estas células tienen una delección simple de un par de bases en el gen *BRCA2*, que tiene como resultado la generación de una proteína truncada disfuncional (60). También posee la mutación G12V en el gen *K-RAS* (61-63) y una mutación inactivante en *TP53* (61). Las células no expresan el gen supresor tumoral *SMAD4/DPC4* (64, 65), y presentan una delección en homocigosis en el gen *P16/CDKN2A* (66, 67).

El medio de cultivo en que se crecieron estas células es IMDM (Isocove's Modified Dulbecco's Medium, Lonza Verviers, Belgium) suplementado con 20% de suero bovino fetal (FBS, inactivado 56°C, 45 minutos), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 2mM de L-glutamina (Lonza Verviers, Belgium), en atmósfera húmeda, a 37°C de temperatura y 5% de CO₂ (59).

La línea tumoral de páncreas **PL45** (ATCC® CRL-2558™) fue adquirida en LGC Promochem, SLU-ATCC (Barcelona, España) (68). Fue aislada por SE Kerm en 1992 de un adenocarcinoma ductal de páncreas, pobremente diferenciado, procedente de un hombre adulto de raza blanca. La línea tumoral presenta las siguientes características: morfología epitelial, adherente con algunas células redondeadas flotantes. A diferencia de la línea tumoral Capan-1, PL45 no posee mutaciones en los genes *BRCA2* y *SMAD4/DPC4* (60, 69). Tiene una mutación activadora en el codón 12 del oncogén *K-RAS*, en donde el triplete GGT pasa a ser GAT, lo que trae consigo la sustitución en la proteína, de glicina por ácido aspártico (G12D) (70). Las células PL45 no tienen mutaciones en el gen supresor tumoral *P16/CDKN2A*, que expresa P16, un inhibidor del complejo Ciclina D/CDK4. Sin embargo, su transcripción está silenciada por metilación de su promotor (66, 71). Esta línea celular tiene una mutación del gen *TP53* en el codón 255, en donde el triplete ATC pasa a ser AAC, con el

resultado de una sustitución del aminoácido isoleucina por asparagina, inactivando la proteína (60).

TABLA 2. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DIFERENCIALES ENTRE LAS LÍNEAS CELULARES
OBJETO DE ESTUDIO

Gen	Capan-1(59)	PL45(68)	Referencias
BRCA2	Deleción.	Wt.	Li et al. 2010 (60)
SMAD4/DPC4	Null.	Wt.	Schutte et al. 1996 (64) Deer et al. 2010 (65) Li et al. 2010 (60) Dempe et al. 2010 (69)
K-RAS	Mutación.	Mutación.	Berrozpe et al. 1994 (61) Jaffee et al. 1998 (70) Kita et al. 1999 (62) Butz et al. 2003 (63) Li et al. 2010 (60)
P16/CDKN2A	Deleción homocigota.	Wt - silenciado por metilación del promotor.	Caldas et al. 1994 (66) Su et al. 2001 (71) Li et al, 2010 (60)
TP53	Mutación.	Mutación.	Berrozpe et al. 1994 (61) Huang et al. 1996 (67) Li et al. 2010 (60)

Wt- wild type; null: mutación que anula la expresión de la proteína.

Las células crecen en monocapa en medio de cultivo RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640, Lonza Verviers, Belgium) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, inactivado a 56°C, 45 minutos), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 2mM de L-glutamina (Lonza Verviers, Belgium), en incubadores a 37°C de temperatura y atmósfera de 95% de humedad y 5% de CO₂ (68).

La Tabla 2 muestra las características genéticas diferenciales entre ambas líneas tumorales de adenocarcinoma ductal de páncreas.

Los fibroblastos utilizados en este trabajo pertenecen a la línea celular **LC5**. Se trata de un cultivo celular proveniente de fibroblastos de pulmón embrionario humano, ampliamente utilizada en trabajos de investigación (72, 73). Esta línea fue amablemente cedida para este trabajo por el Dr.

José Luis Pablos, Jefe del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. Las células crecen en monocapa en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 2mM de L-glutamina (Lonza Verviers, Belgium), en incubadores a 37°C de temperatura, 95% de humedad y 5% de CO₂. La morfología de las células es epitelial. Las células muestran características típicas de células mesenquimales, como laminina, fibronectina y vimentina. Adicionalmente expresan citoqueratinas (73).

La Figura 4 ilustra el aspecto morfológico en cultivo de las tres líneas celulares seleccionadas.

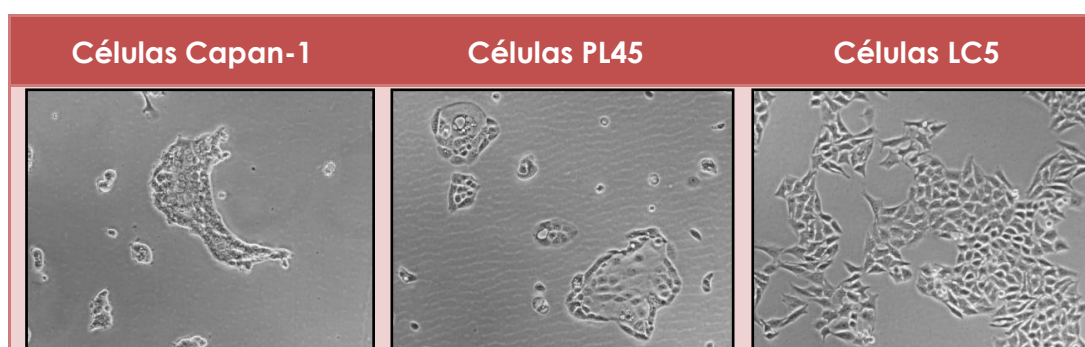


FIGURA 4. FOTOGRAFÍAS EN MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES DE LAS LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS EN EL ESTUDIO.

La línea celular **HEK293T** (células humanas de riñón, de morfología epitelial), fue utilizada para producir células empaquetadoras en los experimentos de transducción (74). El medio y las condiciones fueron los mismos que los utilizados con los fibroblastos.

Todas las líneas celulares utilizadas han sido analizadas periódicamente para la detección de posibles contaminaciones por Mycoplasma, mediante técnicas de luminiscencia con "MycoAlert Assay Control Set" (Lonza Walkersville, INC, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante (75).

6.1.2. Obtención de una línea celular estable de fibroblastos LC5 que expresan GFP.

Para la consecución de los objetivos de este trabajo consideramos necesaria la producción de una línea estable de fibroblastos humanos que expresasen la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein* - Proteína fluorescente verde). El establecimiento de esta línea celular nos permitiría la diferenciación entre los distintos tipos celulares procedentes de los co-cultivos directos y su posterior identificación y separación mediante citometría de flujo implementada con FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*).

Por los motivos expuestos, se generaron partículas lentivirales que incorporan el gen GFP, que luego se utilizaron para infectar los cultivos de fibroblastos.

6.1.2.1. Selección de plásmidos lentivirales.

Los vectores de expresión lentivirales utilizados fueron:

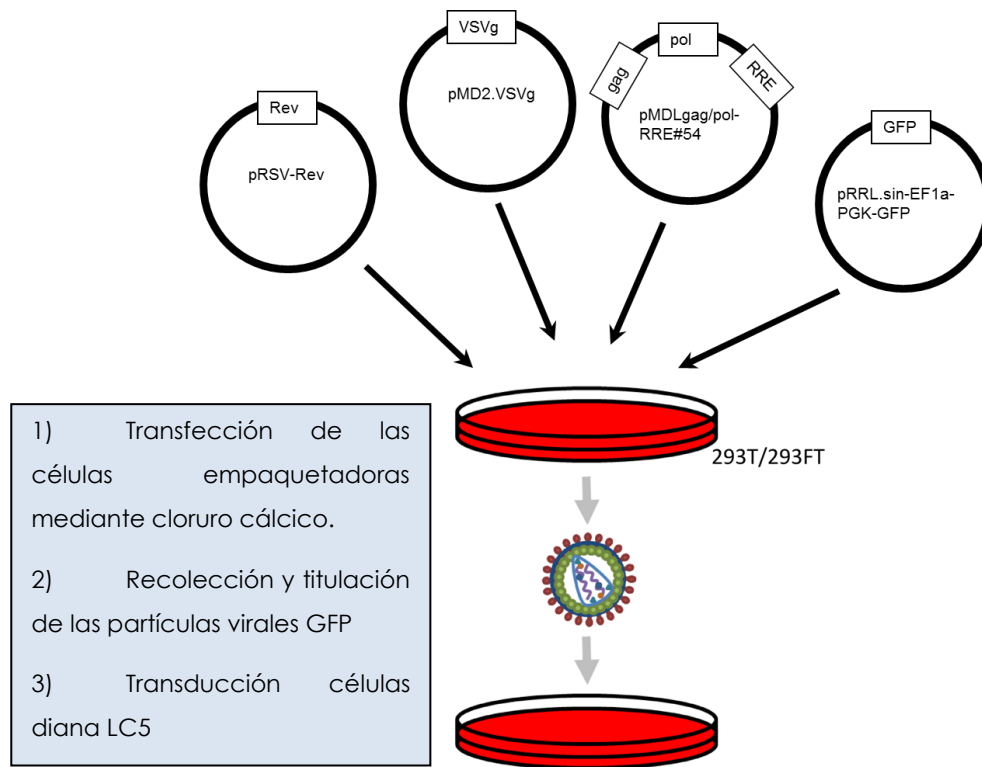
- **pRRL.eGFP:** plásmido de expresión de la proteína fluorescente verde (GFP).
- **pRSV-Rev:** este plásmido lleva el cDNA del gen Rev bajo el promotor transcripcional del virus sincitial respiratorio (RSV). Interactúa con la estructura RRE.
- **pMDLgag/pol-RRE:** este plásmido contiene el RRE (*Rev Response Element*) o elemento de respuesta a Rev. La interacción de Rev con RRE regula la exportación del mRNA al citoplasma y favorece la producción de proteínas virales. Este plásmido lleva también cDNA codificante de proteínas estructurales del virus (cápside, matriz y nucleocápside) y de las enzimas víricas Retrotranscriptasa, Integrasa, Proteasa viral y RNasa H (Gag-Pol).
- **pMD2-VSVg:** vector que lleva la secuencia de la envuelta del virus VSV-G (vesicular stomatitis virus-G).

6.1.2.2. Transducción de células HEK293T por precipitación con CaCl₂.

En los experimentos de transducción se utilizó la línea celular HEK293T como células empaquetadora de las partículas virales (74). Las células crecidas al 30-40% de confluencia fueron incubadas en medio de cultivo fresco durante 3-4 horas antes de la transfección. Posteriormente se preparó la solución de transfección que contenía CaCl₂ 2M, y los plásmidos de los vectores pMDLgag/pol-RRE 14,625 µg, pRSV-Rev 5,625 µg, pMD2-VSVg 7,875 µg y el vector de transferencia pRRL.eGFP. Esta solución se añadió gota a gota sobre el tampón de transfección FBS 2X pH 7 (50 mM Hepes, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄). La mezcla, preincubada 15 minutos a temperatura ambiente, se añadió sobre el cultivo de células empaquetadoras (1/5 del volumen total del medio). A las 24 horas, se cambió el medio, y a las 48 horas se determinó la eficacia de transfección mediante la observación microscópica del porcentaje de células HEK293T GFP-positivas (GFP⁺). Los sobrenadantes, con las partículas virales, se centrifugaron y posteriormente se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro. Los sobrenadantes se conservaron a -80°C hasta su uso.

6.1.2.3. Transducción de fibroblastos LC5 con lentivirus.

Las partículas virales de los sobrenadantes fueron tituladas. Se utilizó una dilución 1/10 de los mismos para transducir los fibroblastos, en presencia de polibreno, para incrementar la eficiencia de la transducción. La expresión de GFP en los fibroblastos, a las 48 horas de cultivo, fue examinada por microscopía de fluorescencia, para verificar la validez del experimento. La transducción de fibroblastos con alta expresión de GFP tuvo lugar en un 30% de células infectadas.

FIGURA 5. PRODUCCIÓN DE FIBROBLASTOS LC5 GFP⁺

6.1.2.4. Separación y aislamiento de LC5-GFP⁺ por FACS.

Las células se levantaron de manera habitual, trypsinizadas, centrifugadas (a 300-1200 rpm durante 5 minutos) y re-suspendidas y lavadas con PBS (*Phosphate buffered saline*) antes de resuspender en el Buffer de Sorting (FBS, PBS 5%, HEPES 25 mM, EDTA 2 mM).

Los fibroblastos-GFP⁺ fueron aislados mediante FACS (*fluorescence activated cell sorting*) con un dispositivo de separación Sony Synergy Cell Sorter (Sony Biotechnology Inc.). La selección y el aislamiento de fibroblastos GFP⁺ se realizó en función de la expresión de GFP y la incorporación de Ioduro de propidio para la exclusión de células muertas.

Tras la separación, la pureza de la fracción resultante fue del 97%. La fracción de fibroblastos-GFP⁺ fue aislada, expandida y criopreservada para su utilización en la puesta a punto de co-cultivos. El proceso se resume en la Figura 5 y en la Figura 6.

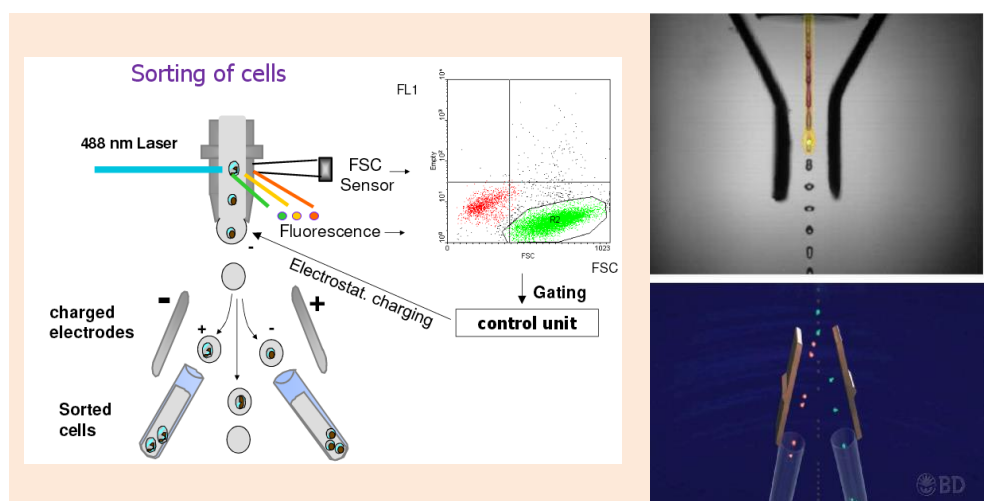


FIGURA 6. PRINCIPIO DE LA SEPARACIÓN CELULAR FACS-(SORTING DE CÉLULAS ASOCIADO A FLUORESCENCIA) (76).

Figura obtenida de
<http://www.meduniwien.ac.at/user/johannes.schmid/MethodsCellBiology2.pdf> (fecha acceso: 1 octubre 2015)

6.1.3. Co-cultivos directos entre líneas celulares de cáncer de páncreas y fibroblastos humanos.

6.1.3.1. Estrategia general para el establecimiento de co-cultivos directos.

El establecimiento de co-cultivos directos de células tumorales y fibroblastos se basó en encontrar las condiciones óptimas de crecimiento para ambas líneas, que permitieran estudiar las interacciones entre ambos tipos celulares, teniendo en cuenta los siguientes criterios (77):

- El medio de crecimiento debe estar optimizado para poder dar soporte a las dos poblaciones.
- Se deben ensayar diferentes *ratios* de poblaciones para la obtención de cultivos estables, donde la población que más prolifera permita el crecimiento de la que menos prolifera. Esta proporción debe estar en el rango de lo observado en el cáncer de páncreas humano.
- Se debe establecer el tiempo de cultivo óptimo para las distintas densidades celulares, para obtener cultivos con una confluencia adecuada.
- Los co-cultivos deben realizarse de manera que se permita la separación de las dos poblaciones (Figura 7).

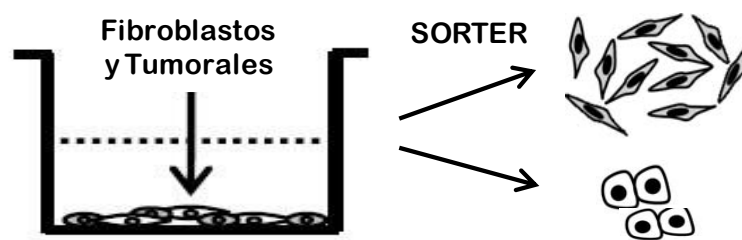


FIGURA 7. CO-CULTIVOS DIRECTOS DE CÉLULAS TUMORALES Y FIBROBLASTOS

Las principales variables que se tuvieron en cuenta fueron:

- I. diferentes medios de crecimiento celular y proporciones de FBS (que contiene factores de crecimiento);
- II. diferentes *ratios* de co-cultivo célula tumoral/fibroblastos;
- III. diferentes momentos de incubación para cada tipo celular,
y
- IV. diferentes tiempos de co-cultivo.

El seguimiento de los co-cultivos se realizó mediante observación directa microscópica de los mismos y mediante citometría de flujo, para así

determinar con exactitud el porcentaje de células de cada línea en los co-cultivos, a través de la cuantificación de células GFP⁻ (líneas de páncreas) y GFP⁺ (fibroblastos).

6.1.3.2. Aislamiento de las poblaciones celulares procedentes del co-cultivo.

Una vez establecidas las condiciones de co-cultivo óptimas, se procedió al aislamiento y separación de las líneas celulares procedentes de los co-cultivos para analizar los posibles cambios moleculares y metabólicos que pudieran tener lugar en las mismas, tras el tiempo de contacto.

Después de permanecer en contacto directo durante 72h, las células fueron lavadas con PBS (*Phosphate buffered saline*) y levantadas con solución Accutase® (Sigma-Aldrich), centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos y re-suspendidas en tampón de selección (*sorting buffer*, FBS, PBS 5%, HEPES 25mM, EDTA 2mM). La separación de las dos poblaciones celulares se llevó a cabo en un Sony Synergy Cell Sorter (Sony Biotechnology Inc.) en función de la expresión de GFP y la incorporación de Ioduro de propidio para la exclusión de células muertas. Las células aisladas fueron centrifugadas y los sedimentos o "pellets" conservados a -80°C hasta su posterior utilización.

6.1.4. Cultivos de líneas celulares de cáncer de páncreas con medio condicionado (secretoma) de fibroblastos humanos.

Para la obtención de medio condicionado o secretoma, se cultivaron fibroblastos en solitario en las mismas densidades de cultivo y medios utilizados en los cultivos directos. Transcurridas 72h y estando los fibroblastos en condiciones de semiconfluencia, se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se filtraron con un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro.

Los secretomas así obtenidos fueron inmediatamente añadidos a los cultivos de células de cáncer de páncreas (Figura 8). Estas células habían sido previamente cultivadas en las mismas condiciones utilizadas para los co-cultivos, aunque sin los fibroblastos. Transcurridas 72h, las células fueron lavadas con PBS y levantadas con una mezcla de tripsina-EDTA, centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos y los pellets conservados a -80°C. Paralelamente, se prepararon cultivos de células tumorales a las que se añadió medio fresco (RPMI, 10% FBS) en lugar del secretoma y que se trataron de manera similar para la obtención de la condición control.

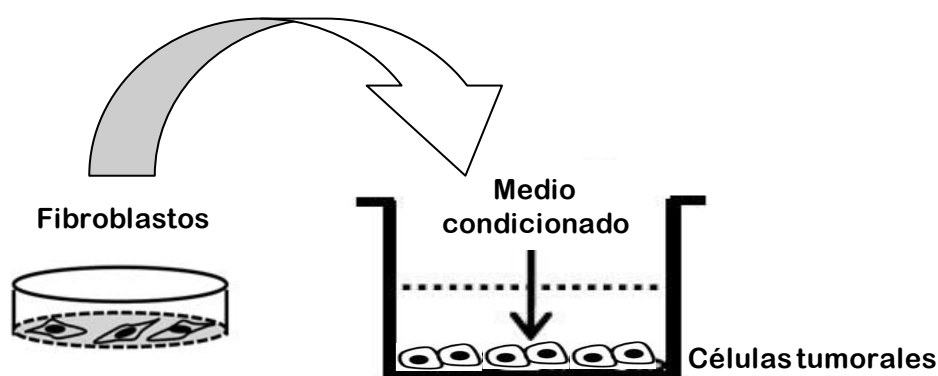


FIGURA 8. CO-CULTIVOS INDIRECTOS DE LÍNEAS DE CÁNCER DE PÁNCREAS CON MEDIO CONDICIONADO (SECRETOMA) DE FIBROBLASTOS.

Así mismo, se obtuvieron los respectivos secretomas o medios condicionados de cada una de las dos líneas de células tumorales. Para ello se siguió la misma pauta descrita anteriormente para la obtención de secretomas de fibroblastos.

6.1.5. Co-cultivos en cámaras Transwell®.

Se utilizó este sistema de cultivo para realizar los estudios de metabolismo energético. Se utilizaron placas Transwell (Transwell® Permeable Supports, Corning; 24mm de diámetro de membrana de policarbonato de 0.4 μm de tamaño de poro) (Figura 9). Mediante este sistema obtendríamos co-cultivos celulares con poblaciones ya separadas físicamente.

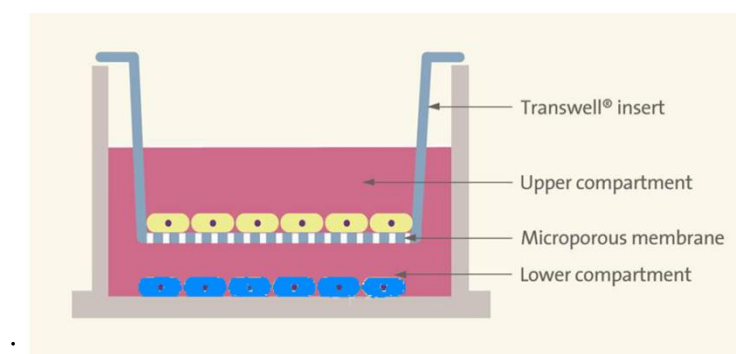


FIGURA 9. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UNA CÁMARA DE CULTIVO TRANSWELL®

Figura obtenida de:

<http://static.fishersci.com/cmsassets/downloads/segment/Scientific/pdf/permeable-supports-corning.pdf> (acceso: 1 Octubre 2015)

Antes de iniciar los experimentos, se equilibraron las membranas de los insertos para facilitar la adherencia de las células. Para ello se preincubaron las placas con suficiente medio de cultivo, una hora, a 37°C. Posteriormente se eliminó el medio y se sembraron 250.000 células tumorales en el compartimento superior, mientras que en el compartimento inferior se sembraron 25.000 fibroblastos. Tras 48 horas en estas condiciones, se recuperaron las células para su análisis posterior.

6.2. ESTUDIOS FUNCIONALES DE MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR.

6.2.1. Ensayos de cierre de herida o cicatrización.

El objetivo de los ensayos de cierre de herida (*wound healing assay*) es estudiar la migración o motilidad de las células tumorales y fibroblastos, sometidas a distintas condiciones experimentales (78). Se utilizaron varios métodos: la técnica de la "herida" (*scratch*), las cámaras de cultivo con insertos.

6.2.1.1. Técnica de la "herida" (*Scratch assay*).

Consiste en determinar la capacidad de migración de las células para cubrir una "herida" realizada a una monocapa celular confluyente. Estos ensayos se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones de Liang et al (79).

Las células tumorales pancreáticas (Capan-1 y PL45) y los fibroblastos (LC5) se cultivaron aisladamente en pocillos de placas P12 hasta lograr una monocapa confluyente (90%). Se realizó la "herida" en la monocapa con ayuda de una punta de pipeta de 200 μ L y a continuación se lavó con PBS para eliminar las células que se hubieran podido desprender con esta manipulación. En estos mismos pocillos, se añadió el secretoma de los fibroblastos a las células tumorales o bien el secretoma de las células tumorales al cultivo de fibroblastos. Se utilizaron como control cultivos con medio fresco, y se observó la velocidad de cierre de la herida en las siguientes 24, 48 y 72 horas. Se tomaron fotografías para el seguimiento del "cierre de la herida" con el objetivo 10x del microscopio Eclipse TE2000-S de Nikon.

6.2.1.2. Ensayos en cámaras de cultivo con inserto.

Para estos experimentos se utilizaron las cámaras de cultivo con inserto Ibidi μ -Dish de 35 mm (*Inycom Biotech*).

Estos insertos están diseñados para delimitar dos reservorios bien definidos, de forma tal que podemos sembrar independientemente cada población celular con el mismo medio de cultivo. Por lo tanto en uno de los lados se sembraron las células tumorales y en el otro, los fibroblastos. Al retirar el inserto queda un espacio inicial de separación entre ambos tipos celulares, que inicialmente es de 500 μ m. El sistema permite observar el comportamiento migratorio de cada una de las líneas celulares y la interacción entre ellas (Figura 10).

Se sembraron en uno de los reservorios células de cáncer de páncreas Capan-1 (7×10^5 células/mL) o PL45 (6×10^5 células/mL) y en el contiguo 3×10^5 células/mL de fibroblastos LC5. Se dejaron crecer 24 horas para permitir la adhesión, tras lo cual se retiró el inserto de silicona. Se rellenó el pocillo con suficiente medio de cultivo con 0,5% de FBS, y se observó el cierre de la "herida" resultante. Se tomaron fotografías a las 0, 24, 48 y 72 horas. También se describió el comportamiento migratorio con el uso del sistema de filmación *time-lapse* del microscopio (LSM 510 META, Zeiss).

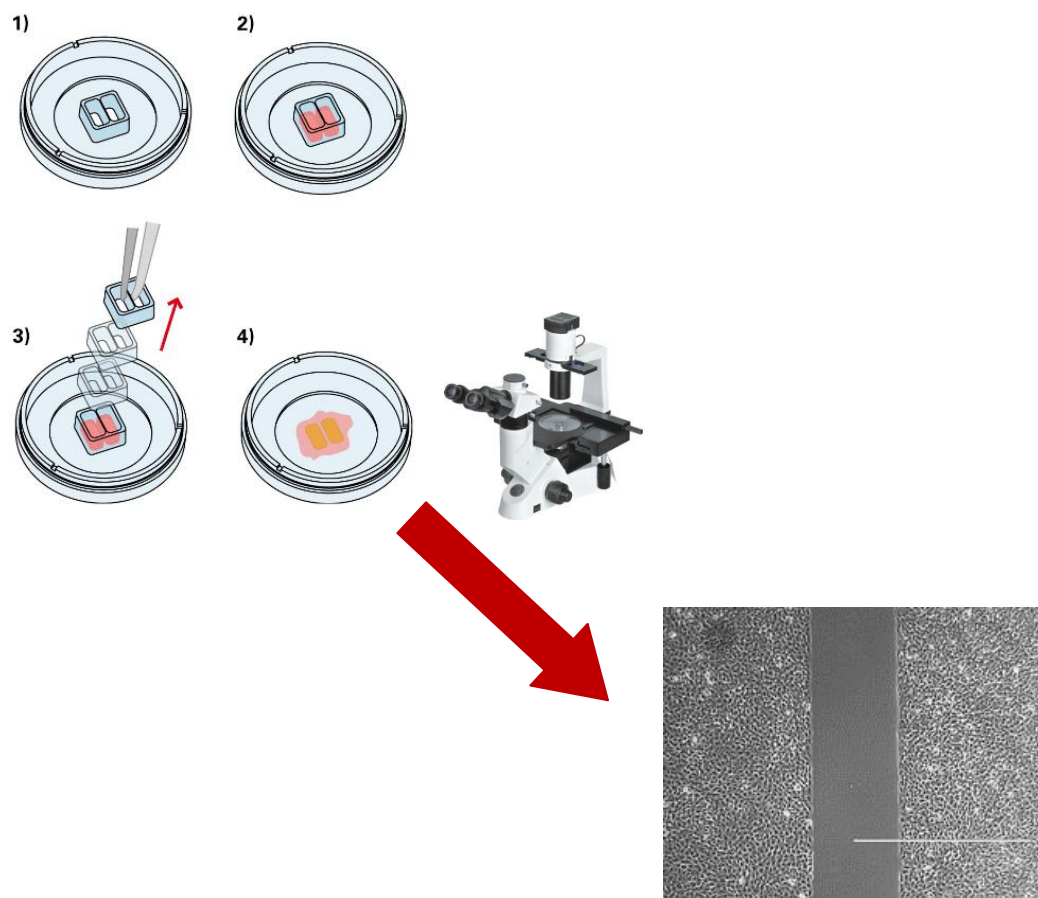


FIGURA 10. ESQUEMA DE TRABAJO CON IBIDI® CULTURE-INSERTS.

- 1.-Preparación de la cámara sobre soporte de cultivo adecuado.
- 2.- Siembra y cultivo hasta estado óptimo de confluencia.
- 3.- Retirada del inserto.

4. Cubrir con medio de cultivo y evaluar mediante microscopio.

Figura obtenida a partir de

http://ibidi.com/fileadmin/products/labware/open_removable/E_8XXXX_CultureInsert/IN_8XXXX_CI.pdf (acceso: 1 octubre 2015)

6.2.2. Ensayos de migración - invasión celular.

Este método evalúa la capacidad invasiva de las células cuantificando su migración a través de una membrana cuando son sometidas a un quimio-atrayente.

Para los ensayos de migración se ha utilizado el método de las placas transwell (Transwell® Permeable Supports, Corning, 24 mm de diámetro del inserto, membrana de policarbonato de 8 µm de tamaño de poro). La membrana debe ser hidratada antes de comenzar el experimento, para mejorar la adhesión de las células a la misma. Para ello las placas se pre-incubaron con medio de cultivo, una hora, a 37°C. En el reservorio superior se sembraron las células tumorales pancreáticas, en un número de 100.000 células por pocillo, que previamente habían crecido privadas de suero durante 24 horas. En el reservorio inferior se sembraron 100000 fibroblastos por pocillo, en 2 mL de medio de cultivo (RPMI 10% FBS). Como control negativo se utilizó medio de cultivo RPMI sin FBS en el reservorio inferior.

Se determinó la migración celular a las 16, 24 y 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo, las membranas de separación de ambos reservorios se fijaron con formaldehído 4% en PBS a temperatura ambiente durante 2 minutos, y permeabilizaron con metanol 100X durante 20 minutos en oscuridad. Después de varios lavados con PBS, se tiñeron los núcleos con DAPI (1:1000). Se observaron al microscopio con aumento de 10x, 20x y filtro ultravioleta, para poder visualizar los núcleos celulares teñidos con DAPI. Primero, se realizaron fotografías para verificar que las células se habían adherido a la membrana. Posteriormente se limpió de células la parte superior de la misma, con un bastoncillo, para eliminar aquellas células que no la hubieran traspasado. Seguidamente se fotografió la membrana de nuevo, una vez limpia. De esta manera, las

células que aparecen tras este proceso son aquellas que han traspasado la membrana y que están situadas en la parte inferior de la misma, por lo que no han sido eliminadas al limpiar con el bastoncillo.

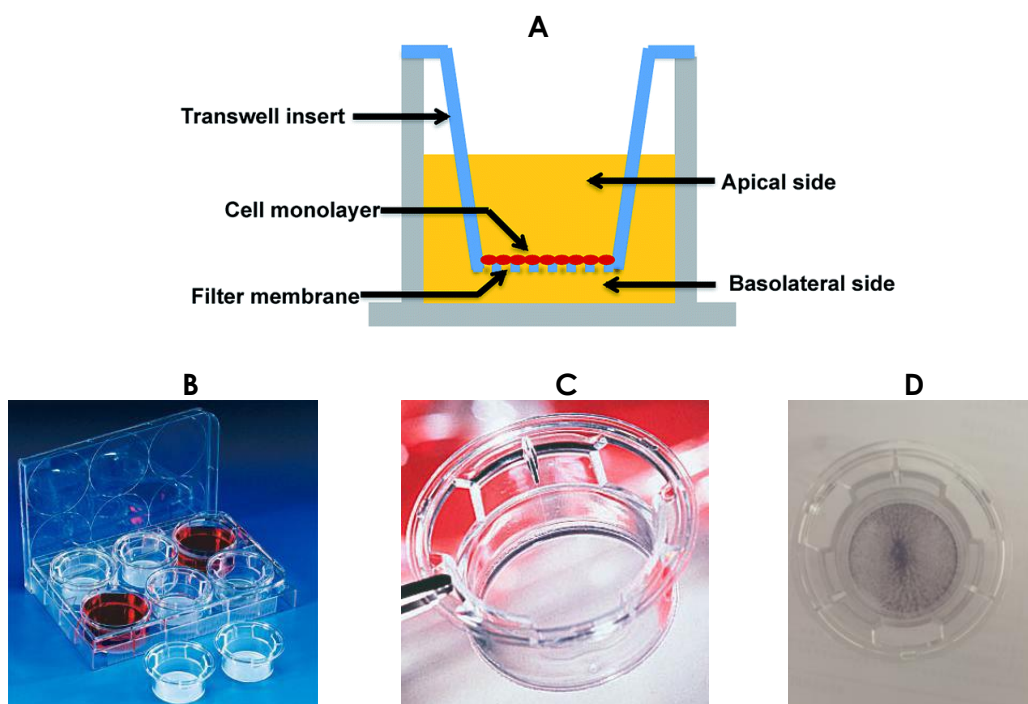


FIGURA 11. PLACAS TRANSWELL® (A, B) Y RESERVORIO SUPERIOR (C) CON CÉLULAS EN LA MEMBRANA TEÑIDAS CON HEMATOXILINA (D).

Figuras obtenida de A: Ref(80); B y C: www.fishersci.com/

6.3. MODIFICACIONES MOLECULARES GLOBALES EN FIBROBLASTOS Y TUMOR.

Para estudiar la existencia de una modificación de los fibroblastos LC5 hacia un fenotipo compatible con CAF, seleccionamos dos marcadores de activación: α -SMA y KGF. El primero por ser un marcador de activación hacia un fenotipo miofibroblástico y el segundo por ser una sustancia que promueve el crecimiento de las células epiteliales tumorales del co-cultivo. El primero se estudió mediante

inmunofluorescencia. El estudio del segundo lo realizamos mediante ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

6.3.1. Expresión de α -SMA en los fibroblastos expuestos a tumor.

Para los ensayos de inmunofluorescencia se utilizaron placas de poliestireno estériles de 24 pocillos (Nuncclon™ Δ Surface). Antes de sembrar las células, se colocaron los cristales de inmunofluorescencia en el fondo de cada uno de los pocillos con 500 μ L de medio de cultivo y se dejaron incubar a 37°C durante una hora. A continuación, se sembraron 50000 células tumorales por pocillo, para cada una de las condiciones del experimento y por triplicado.

Previamente se recolectaron los secretomas o medios condicionados de las células tumorales Capan-1 y PL45. Estos secretomas correspondieron a los medios de cultivo de las células tumorales en los que estuvieron creciendo durante 48 horas. Estos medios se recogieron, se centrifugaron a 1300 r.p.m. durante 5 minutos y se recolectó el sobrenadante. Los secretomas así obtenidos, se guardaron a -80°C hasta su uso.

Setenta y dos horas después de sembrar las células tumorales, se añadieron a los pocillos el mismo número de fibroblastos-GFP⁺, para establecer los co-cultivos directos. Al mismo tiempo, se sembraron en nuevos pocillos 10.000 fibroblastos en medio condicionado de células tumorales (co-cultivos indirectos). Se dejaron en estas condiciones durante 48 horas, observando los pocillos a través del microscopio, a distintos tiempos para identificar el momento de la activación de los fibroblastos.

Para el marcaje inmunofluorescente, se lavaron los pocillos con PBS atemperado a 37°C, realizándose dos lavados de 5 minutos cada uno de ellos. A continuación se fijaron las células con paraformaldehído al 4%, añadiéndose lentamente a cada uno de los pocillos y dejándolo actuar 10 minutos a temperatura ambiente. Se volvieron a realizar dos lavados

de 5 minutos con PBS para eliminar el fijador. La permeabilización de las membranas se hizo con PBS/Tritón al 0,1% durante 5 minutos y en frío (4°C). Tras otro lavado de 5 minutos con PBS se llevó a cabo el bloqueo con suero NGS (suero normal de cabra) al 5% en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se añadió el anticuerpo primario a una dilución de 1:200 en PBS/BSA al 1% y se dejó durante 16 horas a 4°C. Anti α -SMA, Clon 1A4 (Dako, Agilent Technologies), es un anticuerpo monoclonal de ratón que reacciona con miofibroblastos o fibroblastos activados por células tumorales. Tras tres lavados de 5 minutos con PBS, se añadieron durante una hora, a temperatura ambiente, el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón (IgG 1:1000) marcado con rojo fluorescente Alexa Fluor® 594 y el colorante DAPI (1:1000) -para visualizar los núcleos celulares-. Se realizaron de nuevo tres lavados con PBS, de 5 minutos y la preparación se montó con Fluorsave™ Reagent (Calbiochem).

Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Zeiss Axioplan 2, utilizando el programa de tratamiento de imágenes SPOT Advanced.

6.3.2. Expresión de FGF-7/KGF inducida por tumor.

El Quantikine human KGF/FGF-7 inmunoensayo (R&D systems) es un ELISA en fase sólida para medir la expresión de KGF en sobrenadantes de cultivos celulares. Este ensayo utiliza la técnica cuantitativa de inmunoensayo enzimático tipo "sandwich".

El procedimiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Consiste básicamente en: los pocillos de placas de cultivo p96 están pre-revestidos con anticuerpos monoclonales específicos para KGF humano. En estos pocillos se incuban las muestras problemas por duplicado, así como una serie de muestras estándar de concentración conocida que servirán para la obtención de la curva patrón de referencia. El estándar de KGF humano es proporcionado por la casa

comercial y reconstituido en agua desionizada. De la dilución inicial a 20000 pg/mL, se realizan siete diluciones seriadas que serán las utilizadas para la obtención de la curva patrón. El diluyente es proporcionado por la casa comercial. Una vez añadidas las muestras a los pocillos, los KGF presentes en las mismas quedan inmovilizados por los anticuerpos anti-KGF. Tras varios lavados para eliminar cualquier sustancia no unida al anticuerpo de la placa, se añade a cada uno de los pocillos un anticuerpo policlonal unido a enzima, específico para KGF humano. En este caso, el enzima unida al anticuerpo policlonal es la peroxidasa. Se repiten los lavados para eliminar moléculas no unidas y se añade el sustrato (peróxido de hidrógeno) del enzima unido al anticuerpo policlonal, en todos los pocillos de la placa. Después de producirse la consecuente reacción, se desarrolla un color azul en los pocillos, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de KGF unido al anticuerpo monoclonal de la fase inicial. La reacción enzimática se para con ácido sulfúrico 2N. Posteriormente se cuantifica la intensidad de color en un lector de placas "Multimode Plate Reader" EnSpire (PerkinElmer) a una longitud de onda de 450 nm con corrección a 560 nm.

En la siguiente figura representamos la recta patrón obtenida para el análisis de resultados (Figura 12).

Según las especificaciones del fabricante con respecto a la sensibilidad del ensayo, la cantidad mínima de KGF detectable por este método es de 15 pg/mL. El porcentaje de coeficiente de variación intraensayo es de 3,5% y el de interensayo es de 4.3%.

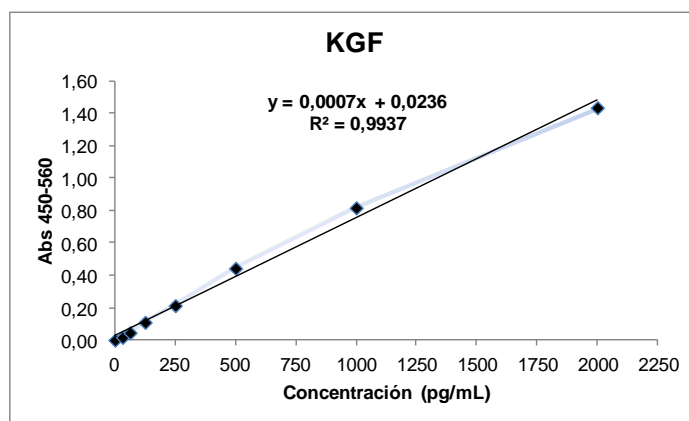


FIGURA 12. ELISA QUANTIKINE HUMAN KGF/FGF-7: RECTA PATRÓN.

6.3.3. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (Western Blot).

Se procedió a la extracción de proteínas totales de todas y cada una de las condiciones de cultivo diseñadas para este trabajo. Una parte importante de este extracto fue utilizado para el análisis proteómico diferencial que se llevará a cabo por electroforesis bidimensional, como se explicará más adelante.

Una alícuota de este extracto, 25 µg de proteínas de cada muestra, se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% (Precast TGX, BioRad). La electroforesis transcurrió durante 15 minutos a 75V y posteriormente 60 minutos a 100V. Los geles fueron transferidos a membranas de Nitrocelulosa (BioRad) en un Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad). Las membranas se preincubaron durante 1 hora en solución de bloqueo (1X TBS, 0,1% Tween-20, 5% leche desnatada en polvo) a temperatura ambiente y, a continuación se incubaron con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C y en agitación. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-E-Cadherina (Ref. 4065, rabbit, dilución 1:1000) de Cell Signaling Technology, Inc., y anti-α-Tubulina (Ref. T8203, mouse, dilución 1:5000) de Sta Cruz Technology. α-Tubulina se utilizó como control de carga de la electroforesis. A la mañana siguiente, las

membranas se lavaron 3 veces con 1X TBS, 0.1% Tween 20 y se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo. Los anticuerpos secundarios empleados fueron goat anti-mouse IgG-HRP (dilución 1:3000) y goat anti-rabbit IgG-HRP (dilución 1:5000) de Sta Cruz Technology. A continuación, la membrana se lavó 2 veces con 1X TBS, 0.1% Tween 20, y 2 veces más con 1X TBS. Como reactivo de revelado se utilizó el kit WesternBright™ (Advansta, CA, USA).

6.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO: ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-D).

La electroforesis bidimensional es una técnica de alta resolución cuyo objetivo es la separación de mezclas complejas de proteínas. En primer lugar, los extractos proteicos se separan en un gel con gradiente de pH inmovilizado en condiciones desnaturizantes, en función de su punto isoelectrónico, lo que se conoce como isoelectroenfoque. Tras esta primera separación (primera dimensión), las proteínas se separan de nuevo en función de su peso molecular (segunda dimensión) por electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia del detergente dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

6.4.1. Preparación de las muestras, extracción y cuantificación de proteínas.

Se prepararon los sedimentos celulares o "pellets" de las siguientes condiciones:

Para las líneas tumorales de páncreas:

- **Condición A:** sedimento celular de la línea tumoral (Capan-1 o PL45) crecida aisladamente. **Condición de referencia.**

- **Condición B:** sedimento celular de la línea tumoral (Capan-1 o PL45) aislada por FACS *sorting*, tras el crecimiento durante 72 horas en co-cultivo con fibroblastos LC5.
- **Condición C:** sedimento celular de la línea tumoral (Capan-1 o PL45) recolectada tras el crecimiento durante 72 horas con medio condicionado o secretoma de fibroblastos.

Para la línea celular de fibroblastos:

- **Condición M1:** sedimento celular de la línea de fibroblastos LC5, crecida aisladamente. **Condición de referencia.**
- **Condición M2:** sedimento celular de fibroblastos LC5, aislados por FACS *sorting*, tras su co-cultivo directo durante 72 horas con la línea tumoral de páncreas Capan-1.
- **Condición M3:** sedimento celular de fibroblastos LC5, aislados por FACS *sorting*, tras su co-cultivo directo durante 72 horas con la línea tumoral de páncreas PL45.
- **Condición M4:** sedimento celular de fibroblastos LC5, aislados tras someterse durante 24 horas al secretoma o medio condicionado (co-cultivo indirecto) de la línea tumoral Capan-1.
- **Condición M5:** sedimento celular de fibroblastos LC5, aislados tras someterse durante 24 horas al secretoma de la línea tumoral PL45.

Se procedió a la extracción de proteínas de todas y cada una de las condiciones especificadas con el kit MCL1 (Sigma), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los extractos proteicos se enviaron para su procesamiento, a la Unidad de Proteómica del Parque Científico de Madrid (Universidad Complutense de Madrid), en donde se llevó a cabo la electroforesis diferencial en gel bidimensional (2D-DIGE).

Para ello se procedió en primer lugar a la limpieza de las muestras, mediante precipitación de proteínas, con el kit 2D clean up kit (GE Healthcare), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los precipitados proteicos se resuspendieron en tampón DIGE (10mM Tris, 7 M

Urea, 2 M Tiourea, 2% CHAPS) y se procedió a la cuantificación de las proteínas usando la técnica colorimétrica de Bradford (BioRad). Posteriormente se procedió a la comprobación de la cuantificación en SDS-PAGE, separando 10 µg de proteínas en un gel al 10% de acrilamida, que fue posteriormente teñido con azul Coomassie coloidal (G-250) (Sigma), según el protocolo del proveedor.

6.4.2. Electroforesis bidimensional.

6.4.2.1. Primera Dimensión: Isoelectroenfoque.

Para ajustar las condiciones del isoelectroenfoque en estas muestras, se hace en primer lugar una mezcla con los extractos de condiciones experimentales de cada línea celular. Se utilizó una cantidad total de proteína de 150 µg, es decir 50 µg de cada condición por gel.

Cada una de las mezclas se aplicó sobre una tira de 24 cm con rango de pH del 3 al 11 (pH3-11 NL, GE Healthcare), que previamente se habían rehidratado con una solución de 8 M de urea, 2 M de tiourea, 4% CHAPS, 2% de solución IPGphor 3-11 y la solución de rehidratación DeStreak (GE Healthcare) durante 8 horas.

El isoelectroenfoque se llevó a cabo en la unidad IPGphor de GE Healthcare. Se realizó a 20°C, siguiendo el programa: 120V durante 1 hora; 500 V durante 2 horas; 500-1000 V en gradiente durante 2 horas; 1000-5000V en gradiente durante 6 h; 5000V durante 10 h. Las tiras acumularon 75.000 Vhs durante este proceso.

Tras el isoelectroenfoque, las tiras se equilibraron por el método de Gorg et al (81). En primer lugar se añadió un tampón de equilibrado compuesto por 100 mM Tris-HCl pH 8,0, Urea 6M, glicerol al 30%, SDS al 2% y ditiotreitól (DTT) al 2%, para mantener el estado reducido de las proteínas desnaturalizadas. Las tiras se mantuvieron durante 12 minutos en este tampón con agitación y a temperatura ambiente. En un segundo

paso, las tiras se equilibraron durante 5 minutos en el mismo tampón de equilibrado descrito anteriormente, en el que se sustituye el DTT por iodoacetamida al 2,5%, para evitar la reoxidación de las proteínas. Finalizando con un lavado con agua destilada, las tiras estuvieron listas para la separación electroforética en una segunda dimensión.

6.4.2.2. Segunda Dimensión: Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

La segunda dimensión se realizó en el sistema Ettan DALT six (GE Healthcare) mediante una SDS-PAGE en geles al 12/2,6 % de concentración de acrilamida/bisacrilamida, utilizando cristales de baja fluorescencia de 26x20 cm (GE Healthcare).

Cada tira IPG se colocó en la superficie del gel, evitando la aparición de burbujas en la superficie entre el gel y la tira. Para fijar ambos geles y evitar pérdidas de proteínas cuando éstas migran de un gel a otro, se preparó una solución de agarosa al 0,5% (P/V). La electroforesis se realizó a 10 W/gel durante 4h, a 18°C.

6.4.2.3. Tinción con azul de Coomassie y captura de imágenes.

Para la visualización de las proteínas tras la segunda dimensión, se tiñeron los geles mediante el protocolo de azul de Coomassie coloidal. Finalizada la electroforesis se procedió a la fijación de los geles en una solución al 50% (V/V) de etanol y 2% (V/V) de ácido fosfórico en agitación, durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación se realizaron tres lavados con agua bidestilada de 10 minutos cada uno. Posteriormente, los geles fueron incubados en una solución el 17% (P/V) de sulfato amónico, 3% de ácido fosfórico y 33% de metanol, durante una hora. A esta solución se añadieron 330 µg de Coomassie Blue G-250, que habían sido resuspendidos en 5 mL de metanol. Esta mezcla se dejó incubando durante 24 horas. Al día siguiente, se lavaron los geles en agua

bidestilada hasta la obtención del contraste adecuado para la digitalización de las imágenes, usando el escáner densitómetro GS-800 de Bio-Rad. La Figura 13 muestra los geles de la electroforesis 2D de los extractos proteicos de las líneas Capan-1 y PL45 y de los Fibroblastos LC5.

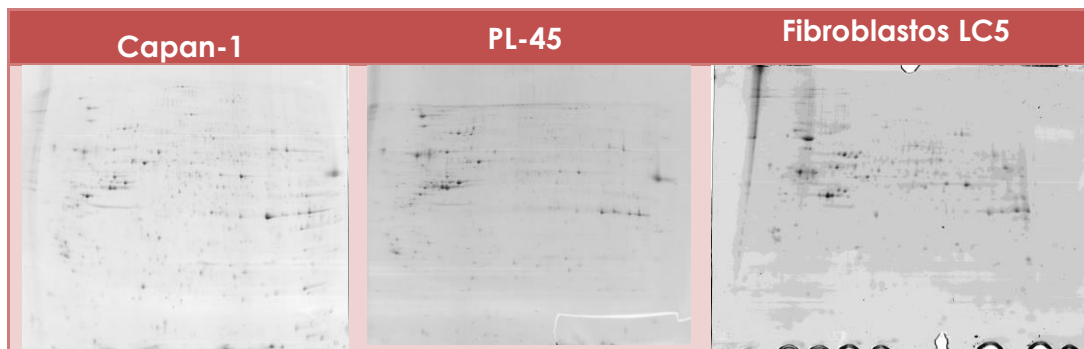


FIGURA 13. ELECTROFORESIS 2D DE EXTRACTOS PROTEICOS DE LAS LÍNEAS CELULARES

6.4.3. Electroforesis diferencial bidimensional en gel: 2D-DIGE (*Differential In-Gel Electrophoresis*).

El DIGE es una variante de la electroforesis bidimensional clásica que permite separar más de una muestra proteica en un único gel, gracias al uso de tres fluorocromos CyDye (Cy3, Cy5 y Cy2, de GE Healthcare), con los que se marcan las proteínas previamente a su separación. Estos fluorocromos son espectralmente diferenciables, teniendo la misma masa y carga, por lo que se pueden obtener imágenes independientes de cada extracto proteico o muestra, una vez separados en el gel 2D-DIGE. De esta manera, se consigue reducir la variabilidad entre geles y se mejora la reproducibilidad y la capacidad de extraer información cuantitativa de los análisis. Así, este sistema permite la cuantificación estadística de pequeñas variaciones en los niveles de expresión de proteínas entre distintas muestras.

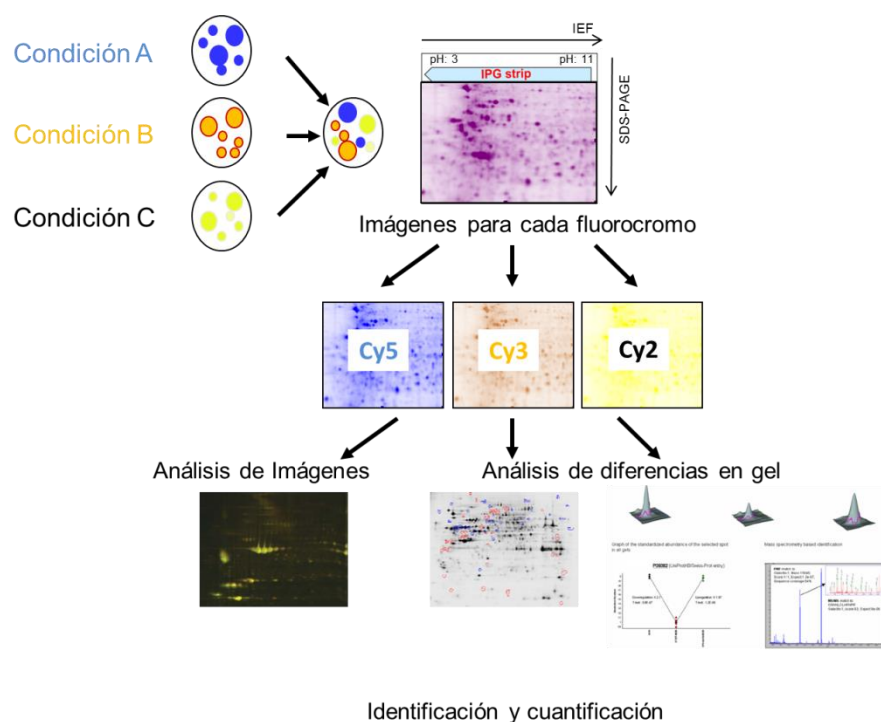


FIGURA 14. ESQUEMA DE LA REALIZACIÓN DE LA ELECTROFORESIS DIFERENCIAL BIDIMENSIONAL (2D-DIGE) CON LOS EXTRACTOS PROTEICOS OBTENIDOS DE LAS LÍNEAS CELULARES TUMORALES.

La Figura 14 esquematiza el proceso de realización de los DIGE a partir de los extractos proteicos aislados de cada línea de células tumorales en cada condición de cultivo (mono-cultivo / co-cultivo directo / cultivo indirecto).

6.4.3.1. Diseño experimental y marcaje de las muestras.

Como se describió previamente (6.1.3.2. Aislamiento de las poblaciones celulares procedentes del co-cultivo.) cada extracto proteico de cada línea y condición se obtuvo a partir de una muestra conjunto (pool celular) obtenida a partir de siembras independientes en varios frascos de cultivos, con el fin de obtener la cantidad necesaria de proteína para el análisis. De acuerdo con las características de esta tecnología, no es necesario realizar réplicas técnicas de los geles para reducir la

variabilidad interna. Por ello y dado que nuestro diseño experimental consiste en la comparación diferencial entre tres condiciones de cultivo distintas (células crecidas aisladamente, en co-cultivo directo, y en co-cultivo indirecto), en dos líneas tumorales de páncreas (Capan-1 y PL45) y una de fibroblastos (LC5) el diseño experimental que se plantea es el siguiente (Figura 15 y Figura 16):

Los fluorocromos se disolvieron a una concentración de uso de 400 pM/ μ L, en dimetil formamida anhidra (Sigma), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las muestras se resuspendieron en 7 M de urea, 2M tiourea, 4% (P/V) de CHAPS y 30 mM Tris-Base y se ajustó el pH a 8,5. Cada 50 μ g de proteína se marcó con 400 pM del fluorocromo correspondiente.

Para llevar a cabo el marcaje descrito, se incubaron las muestras en obscuridad durante 30 minutos y después se paró la reacción con un exceso de lisina (1 μ L de 10 mM Lys).

	Cy5 Condición A	Cy3 Condición B	Cy2 Condición C
Gel 1	Capan-1	Capan-1	Capan-1
Gel 2	PL45	PL45	PL45

FIGURA 15. DIGE: DISEÑO DEL MARCAJE CON FLUOROCROMOS I: LÍNEAS TUMORALES

Condición A: células tumorales crecidas aisladamente.
Condición B: células tumorales crecidas en co-cultivo directo.
Condición C: células tumorales crecidas en co-cultivo indirecto.

	Cy2	Cy3	Cy5
Gel 3	Condición M1	Condición M2	Condición M4
Gel 4	Condición M1	Condición M5	Condición M3

FIGURA 16. DIGE: DISEÑO DEL MARCAJE CON FLUOROCROMOS II: FIBROBLASTOS

Condición M1: fibroblastos crecidos aisladamente.
Condición M2: fibroblastos crecidos en co-cultivo directo (Capan-1).

Condición M4: fibroblastos crecidos en co-cultivo indirecto (Capan-1).

Condición M3: fibroblastos crecidos en co-cultivo directo (PL45).

Condición M5: fibroblastos crecidos en co-cultivo indirecto (PL45).

6.4.3.2. Electroforesis bidimensional: geles.

Las muestras marcadas pertenecientes a un mismo gel, según el diseño experimental descrito anteriormente, se mezclaron en un único tubo antes de añadir el tampón de carga para el isoelectroenfoque de las muestras. Se modificó la solución con respecto a la descrita anteriormente, utilizando el doble de concentración de DTT (200 mM) y de anfolitos (4%), en una relación 1:1. El proceso se realizó en oscuridad debido a la fotosensibilidad de los fluorocromos.

El isoelectroenfoque se realizó a 20°C siguiendo un programa que aumenta el número de V*h totales que acumulará la tira: 120V durante 1 h; 500V durante 2 h; 500-2000V en gradiente durante 2 h; 1000-6000V en gradiente durante 6 h; 6000V durante 12 h. Las tiras acumularon unos totales aproximados de 84.000 V*h (líneas celulares tumorales) y 91000 V*h (fibroblastos) (Figura 17).

Tras el isoelectroenfoque, las tiras son equilibradas según se ha detallado en el apartado 6.4.2.1. Primera Dimensión: Isoelectroenfoque. Cada tira se aplicó posteriormente en un gel para realizar la electroforesis SDS-PAGE tal y como se ha descrito anteriormente (6.4.2.2. Segunda Dimensión: Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.).

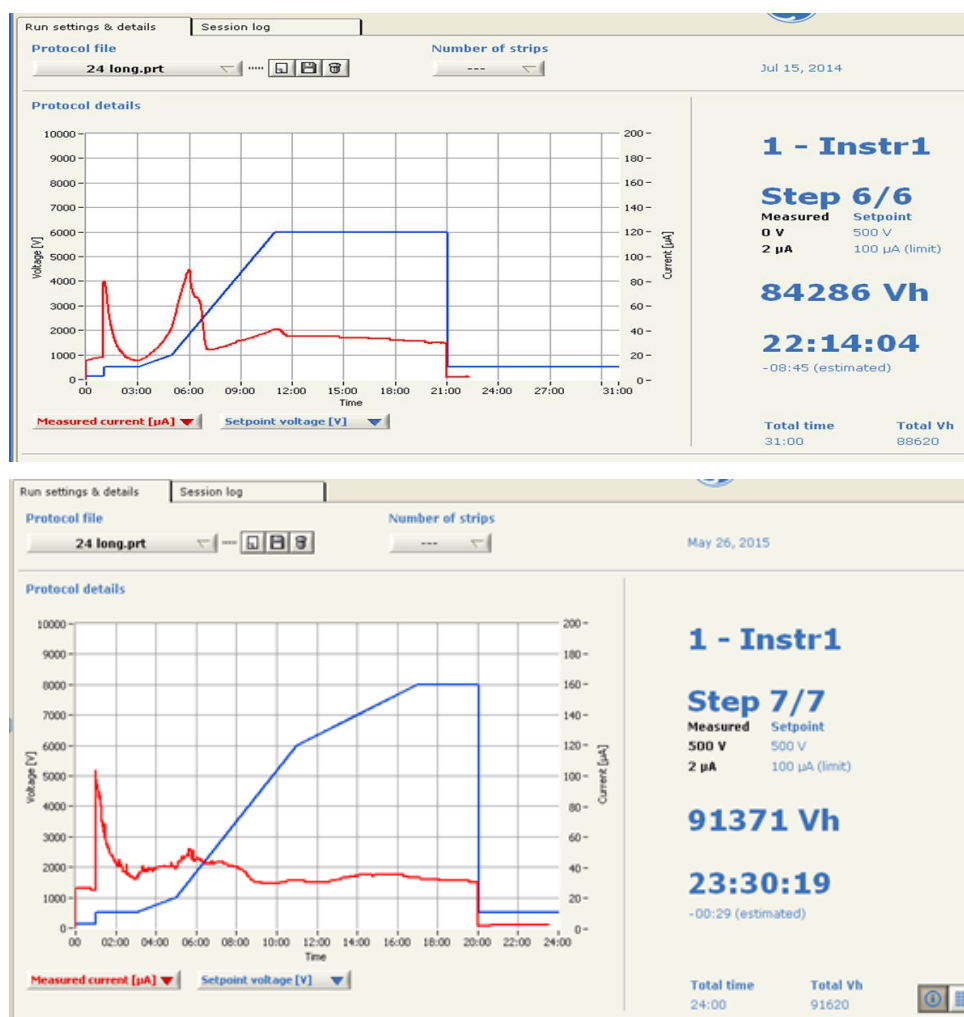


FIGURA 17. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA VARIACIÓN DE LA INTENSIDAD Y LA DIFERENCIA DE POTENCIAL (V) DURANTE EL PROGRAMA DE ISOELECTROENFOQUE DE LOS GELES DIGE. EJEMPLOS DE CAPAN-1 (ARRIBA) Y FIBROBLASTOS (DEBAJO).

6.4.3.3. Adquisición de las imágenes.

Las imágenes de los geles 2D-DIGE se digitalizaron utilizando un escáner de fluorescencia Typhoon Trio (GE Healthcare). Las imágenes emitidas por cada fluorocromo (Cy2, Cy3 y Cy5) se digitalizaron separadamente a 488nm/520nm, 532nm/580nm y 633nm/670nm de longitud de onda excitación/emisión respectivamente (Figura 18, a una resolución de 100 μm de tamaño de pixel. Las imágenes fueron importadas al programa

DeCyder Differential Analysis Software (GE Healthcare), con el que se procedió a su análisis y a su cuantificación.

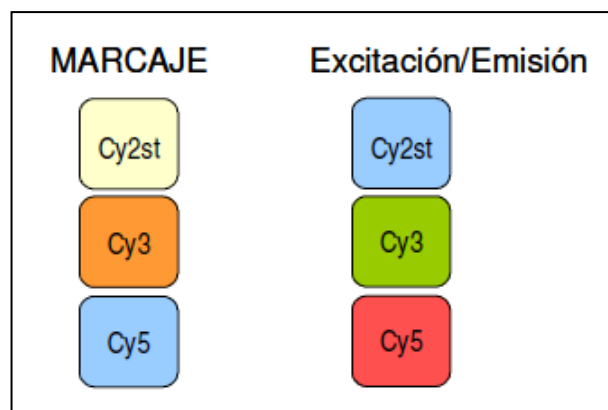


FIGURA 18. DIGE: LEYENDA DE LOS COLORES DE LOS FLUOROCROMOS.

Una vez digitalizados con el escáner de fluorescencia, los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal y se adquirió la imagen de nuevo.

6.4.3.4. Análisis de las imágenes.

Las imágenes obtenidas de los geles 2D-DIGE en el escáner, se acotaron usando el programa informático *ImageQuant v5.1* (GE Healthcare). Se recortaron las imágenes para eliminar aquellas partes del gel que no contenían manchas proteicas. De este modo, fueron importadas al programa de análisis de imágenes digitalizadas *DeCyder Differential Analysis Software v6.5* (GE Healthcare). Dentro de este programa y mediante la base de datos Oracle, se generó un proyecto en el que se incluyeron todas las imágenes de los geles.

A continuación, todos los mapas proteicos del mismo proyecto se analizaron mediante el módulo DIA (*Differential In-Gel Analysis*), que detecta, cuantifica y compara las manchas proteicas de las tres imágenes (Cy2, Cy3, Cy5) correspondientes a cada gel. El algoritmo que emplea este módulo se basa en la co-detección de las tres señales fluorescentes, donde se especificó la detección del máximo número de

manchas posibles. La co-detección de manchas proteicas se hizo conforme al algoritmo del software, permitiendo diferenciar las señales de manchas verdaderas de los artefactos del gel. Posteriormente, se hizo un filtrado de aquellas manchas que se identificaron como fondo, y se eliminaron aquellas cuyo volumen fue menor de 100000 (volumen

TABLA 3. PAREJAS DE COMPARACIONES DIGE.

Célula	Condición	Explicación
Capan-1	B vs A	Co-cultivo directo vs mono-cultivo Capan-1
	C vs A	Cultivo con secretoma Fibroblasto vs mono-cultivo Capan-1
	B vs C	Co-cultivo directo vs cultivo con secretoma fibroblasto
PL45	B vs A	Co-cultivo directo vs mono-cultivo PL45
	C vs A	Cultivo con secretoma fibroblasto vs mono-cultivo PL45
	B vs C	Co-cultivo directo vs cultivo con secretoma Fibroblasto
Fibroblasto LC5	M2 vs M1	Co-cultivo con Capan-1 vs mono-cultivo LC5
	M4 vs M1	Cultivo con secretoma Capan-1 vs mono-cultivo LC5
	M2 vs M4	Co-cultivo con Capan-1 Vs cultivo con secretoma Capan-1
	M3 vs M1	Co-cultivo con PL-45 vs mono-cultivo LC5
	M5 vs M1	Cultivo con secretoma PL45 vs mono-cultivo LC5
	M3 vs M5	Co-cultivo con PL45 vs cultivo con secretoma de PL45

estimado de fondo para este experimento). En todos los casos hubo que eliminar y/o incluir alguna mancha de forma manual. En total, se generaron 4 módulos de trabajo independientes correspondientes a los geles DIGE realizados en esta tesis: un gel con tres condiciones de cultivo

de Capan 1, otro gel con tres condiciones de cultivo de PL-45 y otros dos geles con 3 condiciones de cultivo de fibroblastos LC5, cada uno.

La comparación de proteomas se realizó por parejas, tomando como referencia el del mono-cultivo de la especie celular pertinente (Tabla 3).

Tras la normalización de los valores de abundancia, se obtiene, para cada pareja de análisis, una distribución de las diferencias normalizadas en la abundancia de cada *spot*. Se considera la desviación estándar (SD) como valor umbral para definir un cambio.

6.4.4. Identificación de proteínas por Espectrometría de Masas (MS).

Las manchas proteicas seleccionadas por su abundancia diferencial se extrajeron manualmente de los geles preparativos usando puntas de pipeta. Las proteínas seleccionadas para el análisis se redujeron, se alquilaron y posteriormente se digirieron con tripsina según el método descrito por Shevchenko et al (82), que se expone brevemente a continuación.

Las manchas proteicas se lavaron dos veces con agua y se sumergieron durante 15 minutos en 100% de acetonitrilo. Se secaron en un concentrador Savant Speed Vac (Thermo Scientific) durante 30 minutos. Posteriormente, las muestras se redujeron con 10 mM ditioneitol (DTT) en 25 mM de bicarbonato amónico durante 30 minutos a 56°C, y más tarde se alquilaron con 55 mM de bicarbonato amónico. Finalmente, las muestras se digirieron con 12.5 ng/μL de una tripsina modificada resistente a la digestión autolítica, *Sequencing grade trypsin* (Roche Molecular Biochemicals) en 25 mM de bicarbonato amónico a pH 8.5 durante 24 horas a 37°C.

Después de la digestión, se recuperó el sobrenadante y se cargó 1 μL en una placa específica para MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) y se dejó secar a temperatura ambiente. Después

se añadieron 0.4 μ L de 3 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxi-transcinámico (Sigma) en 50% de acetonitrilo a las manchas proteicas digeridas y secas, y se volvieron a dejar secar a temperatura ambiente. Los análisis MALDI-TOF/TOF (*Time-Of-Flight*) se realizaron en un espectrómetro de masas MALTI-TOF/TOF 4800 Proteomic Analyzer (Applied Biosystems), en el Servicio de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. El MALDI-TOF/TOF se llevó a cabo en modo de reflector positivo con un voltaje de aceleración de 20.000 V. Todos los espectros de masa se calibraron internamente usando péptidos procedentes de la autodigestión con tripsina.

El análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF produce huellas de masa peptídica y los péptidos observados con una relación señal-ruido superior a 10 se cotejaron y se representaron como una lista de pesos moleculares monoisotópicos.

Para la identificación de proteínas se utilizó la base de datos SwissProt DB v.57.15 (515203 secuencias, 181334896 residuos) con restricción taxonómica para *Homo sapiens* (20266 secuencias). Los péptidos del MALDI TOF/TOF se analizaron usando MASCOT 2.2 (www.matrixscience.com) a través del servidor Global Protein Server v3.6 de ABSciex. Los parámetros de búsqueda que se usaron fueron: "carbamido-metil cisteína", como modificación fija y "oxidación de metionina" como una modificación variable; "Tripsina" como enzima de digestión; número máximo de sitios con pérdida de corte: "1"; estado de carga del péptido: "+1"; tolerancia de los fragmentos MS-MS: ± 0.3 Da.

Para la asignación de proteínas a las huellas peptídicas obtenidas, se fijó como umbral de significación estadística una P menor a 0,05.

6.4.5. Metodología para la interpretación de los resultados de proteómica.

6.4.5.1. Re-codificación de las proteínas identificadas.

Los resultados del DIGE y espectrometría de masas identifican proteínas utilizando la base de datos MASCOT (83). Para cada línea celular y *spot* del DIGE, se recodificó el nombre de la proteína identificada buscando su equivalente en la base de datos Uniprot (84).

6.4.5.2. Eliminación de redundancias y de información equívoca.

En algunas circunstancias se observó, para un mismo análisis, repeticiones de una proteína con diferentes *spots* en el DIGE. Una explicación razonable es que se trataran de modificaciones post-traduccionales. Para el análisis de sistemas y la interpretación funcional, se eliminaron repeticiones.

6.4.5.3. Construcción del mapa de variaciones (*Heatmap*).

El valor numérico para cada proteína en cada línea celular y condición fue +1 o -1, según si estaba aumentada o disminuida. Para construir el mapa de variaciones (*Heatmap*) se utilizó un programa basado en R. El análisis de *clusters* jerarquizados se realizó mediante la función *R hclust function*, considerando las distancias entre proteínas en las diferentes condiciones. Este análisis inicialmente asigna a cada proteína a su propio cluster. De forma progresiva, según se desarrolla el algoritmo de cálculo, en cada paso se unen los dos *clusters* más similares. En cada etapa del proceso, las distancias entre *clusters* se calculan mediante la fórmula de dis-similaridad de Lance-Williams (85, 86).

6.4.5.4. Análisis de las vías moleculares KEGG (87).

Una vez re-codificadas las proteínas según Uniprot, se puede obtener su código *Entrez Gene ID* (88). Desde esta base de datos se puede llegar a la base de datos de vías moleculares KEGG (Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas) (87, 89). Para analizar estadísticamente asociaciones con vías moleculares, se utilizó la herramienta *Webgestalt* (90, 91). Los análisis de enriquecimiento se realizaron utilizando técnicas estadísticas para muestras con solapamiento, como la distribución hipergeométrica con la corrección de Benjamini & Hochberg (92).

6.4.5.5. Análisis GO (*Gene Ontology*).

El proyecto GO tiene como objetivo describir los productos de los genes en tres niveles ontológicos estructurados: los procesos biológicos asociados, los componentes celulares y las funciones moleculares, de manera independiente de la especie (93).

Con los códigos de las proteínas identificadas se obtuvo la información sobre la función, localización celular y los procesos biológicos, utilizando las plataformas GO (93) y GOSlim (94). Para el análisis estadístico también se usó la distribución hipergeométrica ajustada por la corrección de Benjamin & Hochberg. Para hacer este análisis se utilizó la aplicación BiNGO (95) del programa CytoScape(96). Cytoscape es una plataforma basada en programación con código abierto y de distribución gratuita, que permite la visualización de redes complejas.

6.4.5.6. Análisis de interacciones proteína-proteína.

Para explorar las interacciones de las proteínas identificadas y cuantificadas en este estudio, se utilizó el programa Cytoscape. Para generar los gráficos de las interacciones se usó PSI-MI XML 2.5.

6.5. METABOLISMO CELULAR BIOENERGÉTICO EN LÍNEAS TUMORALES PANCREÁTICAS Y FIBROBLASTOS.

6.5.1. Condiciones de cultivo.

A la hora de estudiar posibles cambios en metabolismo energético tanto en las células tumorales como en los fibroblastos, se advirtió que el propio procesamiento de las células al pasar por el *FACS-Sorter* podría interferir en los resultados. Por ello se optó por un diseño experimental diferente. Se utilizó el método de las placas Transwell descrito en 6.1.5. Co-cultivos en cámaras Transwell®.

El experimento se llevó a cabo por cuadruplicado y se realizaron tres repeticiones independientes del mismo.

6.5.2. Análisis cuantitativo de proteínas del metabolismo (RPPMA, *Reverse phase protein microarray*).

Para la identificación de las variaciones en la firma energética de las poblaciones celulares estudiadas, en las condiciones establecidas anteriormente, se realizó un acuerdo de colaboración con el equipo PROTEOmAb del Centro de Biología Molecular (CSIC), en concreto con los doctores José M. Cuezva y Carmen Cuevas-Martín.

Dicho equipo realizó un estudio cuantitativo de expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético celular (Tabla 4).

6.5.2.1. Validación de anticuerpos.

La extracción de proteínas de los extractos celulares se realizó con T-PER *Tissue Protein Extraction Reagent* (Thermo Scientific, Inc), con inhibidores de proteasas (Roche) y de fosfatasa (Sigma Aldrich) en un ratio de 1/5 (P/V). Los extractos celulares se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido. La concentración de proteínas fue

calculada con el reactivo de Bradford (Bio-Rad, Inc), utilizando BSA (*Bovine serum albumin*) como estándar.

TABLA 4. PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO ESTUDIADAS

FUNCIÓN	PROTEÍNA
Glicolisis	GAPDH: Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa PK-M2: Piruvato quinasa M2 LDHA: Lactato deshidrogenasa A
Fosforilación oxidativa	NDUFS3: NADH deshidrogenasa ubiquinona hierro-sulfuro proteína 3, mitocondrial, SDHB: Succinato deshidrogenasa [ubiquinona] hierro-sulfuro subunidad B, mitocondrial CORE-2: Complejo citocromo b-c1 subunidad 2, mitocondrial COXII: Citocromo c oxidasa II mitocondrial β-F1: ATP sintasa F1-subunidad β, mitocondrial IF1: Inhibidor de ATPasa, mitocondrial
Sistema antioxidante	SOD2: Superóxido dismutasa [Mn], mitocondrial Catalasa
Metabolismo mitocondrial	PDHe: Piruvato deshidrogenasa E1, subunidad α, mitocondrial HADHA: Enzima trifuncional, subunidad α, mitocondrial
Estructura mitocondrial	HSP60: 60 kDa <i>Heat shock protein</i> , mitocondrial
Ruta de las Pentosas-Fosfato	G6PDH: Glucosa 6-P deshidrogenasa

Para la validación de los anticuerpos usados en el estudio, 20 µg de extractos proteicos se sometieron a fraccionamiento en geles del 9% o 12% SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida) en presencia de urea 4M. Tras la electrotransferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa, éstas fueron incubadas con los anticuerpos correspondientes. Sólo aquellos anticuerpos que reconocieron una única

banda proteica correspondiente al peso molecular esperado, fueron seleccionados para el estudio.

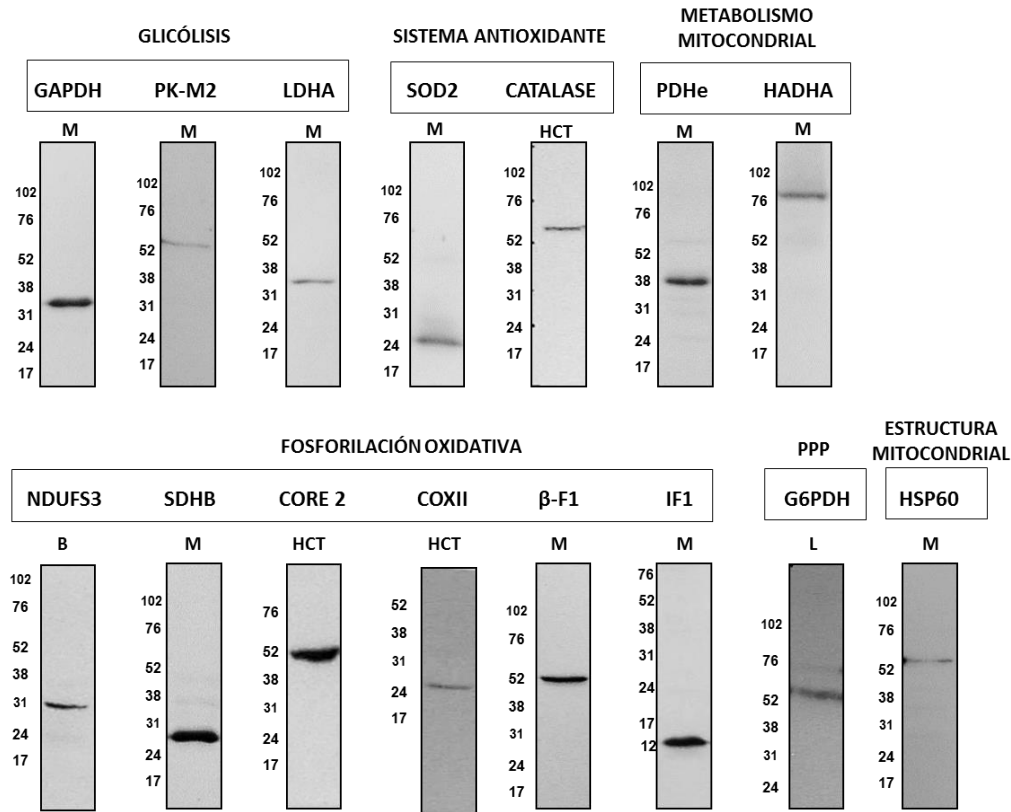


FIGURA 19. VALIDACIÓN DE ANTICUERPOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE METABOLISMO ENERGÉTICO.

M: Músculo; B: Cerebro (Brain); HCT: línea tumoral HCT116; L: Hígado (liver). PPP: Ruta de las Pentosas Fosfato

Los anticuerpos primarios y las concentraciones utilizados en el estudio fueron: anti-NDUF53 (1:100) y anti-COXII (1:100), anti-HADHA (1:100) y anti-SOD2 (1:100) de Abcam; anti-PDHe (1:100) y anti-SDH-B (1:500) de Invitrogen; anti-CORE 2 (1:1000) de Mitosciences; y anti-CATALASE (1:5000) de Sigma-Aldrich. Los anticuerpos monoclonales anti- β -F1-ATPase clon 11/21-7A8 (1:2500), anti-GAPDH clon 273A-E5 (1:250), anti-PK-M2 clon 14/5-21/24 (1:250), y anti-HSP60 clon 17/9-15G1 (1:250) (97), y anti-LHDA clon 4D3-A1 (1:2500)(98) fueron producidos en el laboratorio del Dr. Cuezva

(PROTEOmAb, CBMSO); anti-G6PDH (1:500) de Thermo Scientific; y anti-IF1 (1:100) de Molecular Probes.

6.5.2.2. RPPMA: Microarray de proteínas en fase reversa.

Los extractos proteicos fueron diluidos en PBS a una concentración final de proteínas de 0.75 µg/µL antes de su impresión en el array. Las muestras se imprimen por duplicado a 0.75 ng por spot. Se utilizó la línea tumoral de colon HCT116 en cantidades crecientes desde 0 a 1 µg/µL como control para evaluar la expresión de las distintas proteínas en las muestras. La recta resultante se utiliza para interpolar las intensidades de las muestras impresas. Los extractos de HCT116 indicaron un incremento lineal de intensidad de fluorescencia directamente relacionado con la cantidad de proteína analizada, proporcionando la curva estándar del ensayo (Figura 20). Como control negativo interno se utilizó una curva de BSA desde 0 µg/µL a 1 µg/µL. Para normalizar todos los spots se utilizó Fast Green FCF de Sigma.

De cada muestra se analizó 1 nL, por duplicado, en portaobjetos recubiertos de nitrocelulosa (FAST Slides, Schleicher & Schuell BioScience, Inc.), utilizando un BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer printer (Bio-Rad Laboratories, Inc.) equipado con punta sólida (310S), a temperatura y humedad constantes.

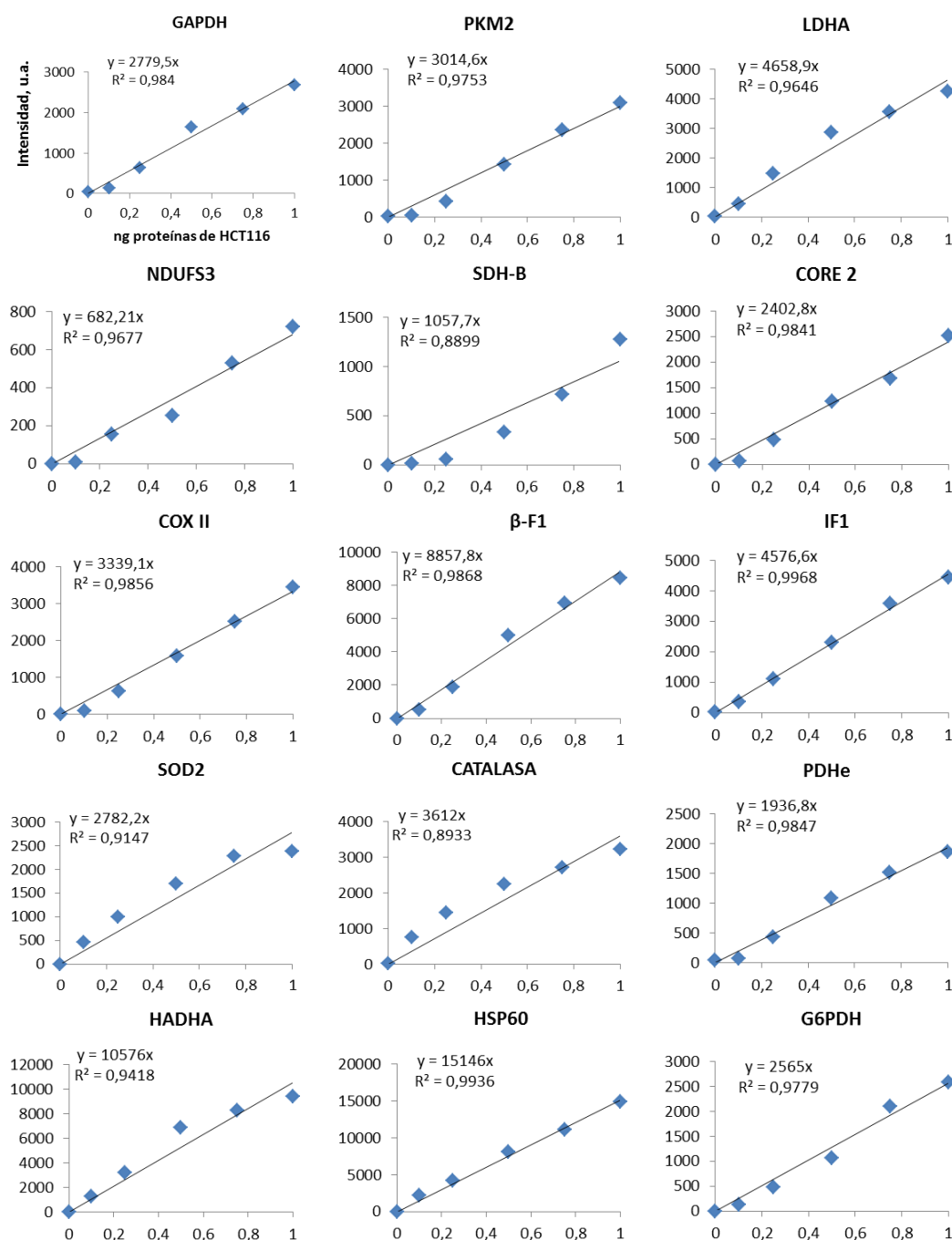


FIGURA 20. CURVAS ESTÁNDAR PARA LOS ANTICUERPOS UTILIZADOS EN EL ARRAY (EN LÍNEA CELULAR TUMORAL HCT-116 CÁNCER DE COLON)

Tras la incubación con los anticuerpos correspondientes, las matrices (Figura 21) fueron secadas al aire y posteriormente bloqueadas con PBS-T con 5% de leche desnatada. Posteriormente, se incubó la matriz con los anticuerpos primarios correspondientes, a las concentraciones indicadas

anteriormente, durante toda la noche a 4°C. A continuación, las matrices se lavaron con PBS-T y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón y anti-conejo, dependiendo del anticuerpo primario, conjugado con Alexa-647 (Invitrogen).

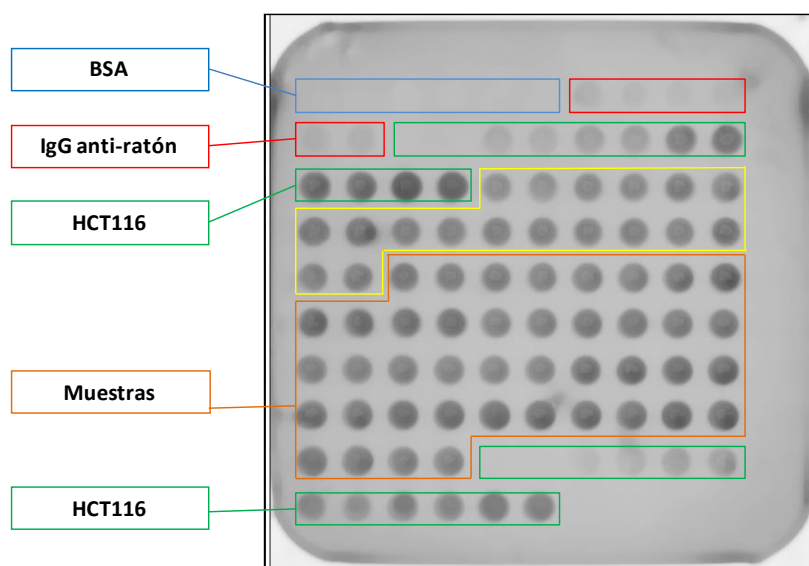


FIGURA 21. MATRIZ DE PROTEIN-ARRAY DISEÑADA PARA ESTE ESTUDIO

(BSA.- Seroalbúmina bovina. HCT116-línea celular control de cáncer de colon).

Las matrices fueron escaneadas con un escáner Typhoon 9410 (GE Healthcare, Inc.). La intensidad media de fluorescencia de las manchas se cuantificó utilizando el software Image J (NIH, EE.UU.) y se convirtieron en pg de proteína por ng de proteína total, usando las relaciones de intensidad de fluorescencia obtenidas en la curva estándar.

6.5.3. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en cada una de las mediciones se expresaron en tablas y figuras como media \pm error estándar de la media (SEM). El análisis de la expresión diferencial de los distintos marcadores bioenergéticos utilizados en este estudio se llevó a cabo con el test t de Student de dos

colas. El análisis de la varianza de un factor (ANOVA) se empleó para detectar diferencias en la firma bioenergética entre las células cultivadas en las diferentes condiciones de co-cultivo y las mismas células en monocultivo (célula tumoral o fibroblasto en cada caso).

Los análisis estadísticos se realizaron usando Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA), Statgraphics (Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, VA) y Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA). Se consideró que existían diferencias significativas en los casos de $P < 0.05$. Los límites de los intervalos de confianza se establecieron para el 95% de probabilidad.



Resultados.

7. RESULTADOS.

7.1. ESTABLECIMIENTO Y OPTIMIZACIÓN DE CO-CULTIVOS.

7.1.1. Producción de Fibroblastos LC5-GFP+.

El proceso de transducción y selección descrito en Materiales y Métodos (6.1.2. Obtención de una línea celular estable de fibroblastos LC5 que expresan GFP.) generó una población de fibroblastos viables con un enriquecimiento de más del 90% en LC5-GFP⁺ (Figura 22).

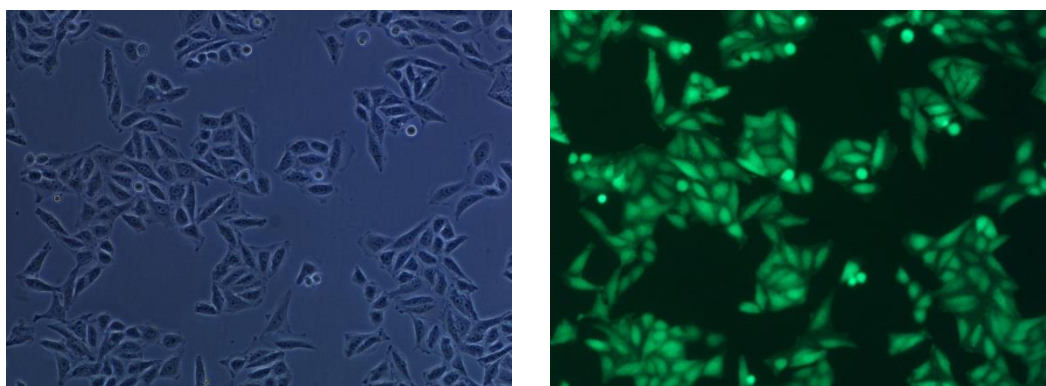


FIGURA 22. FIBROBLASTOS LC5-GFP⁺ TRAS FACS SORTING

7.1.2. Co-cultivos directos en 2-D entre líneas tumorales de páncreas y fibroblastos.

La optimización de los co-cultivos directos en 2 dimensiones entre las líneas tumorales de páncreas Capan-1 y PL45, y los fibroblastos LC5-GFP⁺ se basó en el seguimiento de los cultivos establecidos a partir de distintos *ratios* celulares, en medios de cultivo con diferentes porcentajes de FBS.

El seguimiento se realizó mediante la observación microscópica de los co-cultivos y posterior comprobación, mediante citometría de flujo, del porcentaje de cada línea celular, a través de la cuantificación de células

RESULTADOS

GFP negativas (líneas de cáncer de páncreas) y células GFP positivas (fibroblastos modificados) (Figura 23).

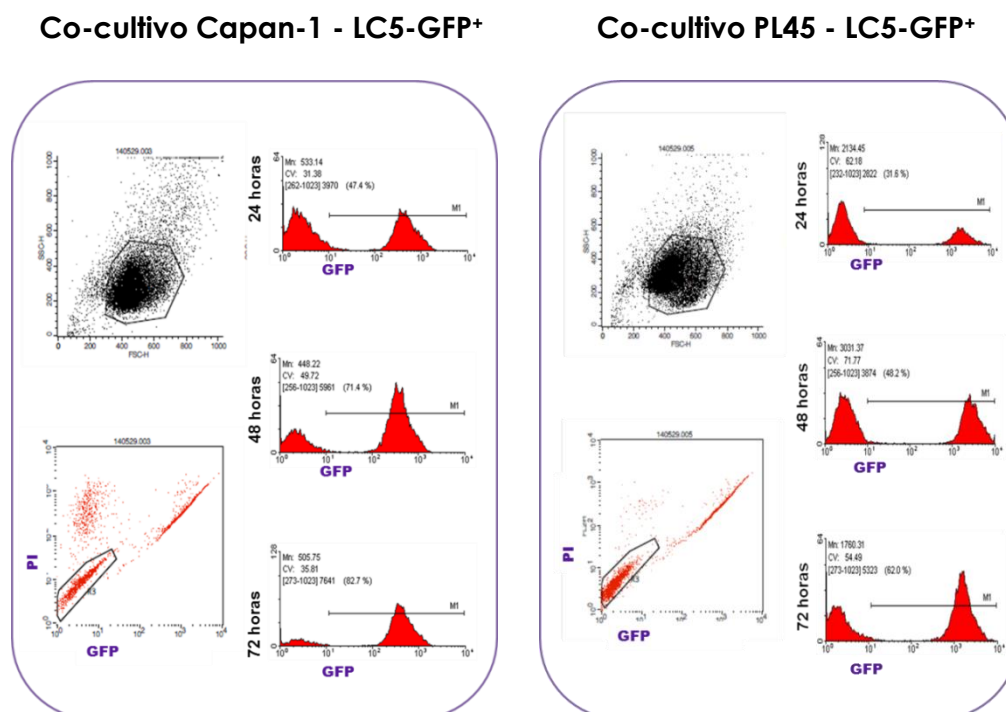


FIGURA 23. OPTIMIZACIÓN DE CO-CULTIVOS DE LÍNEAS TUMORALES PANCREÁTICAS Y FIBROBLASTOS GFP+.

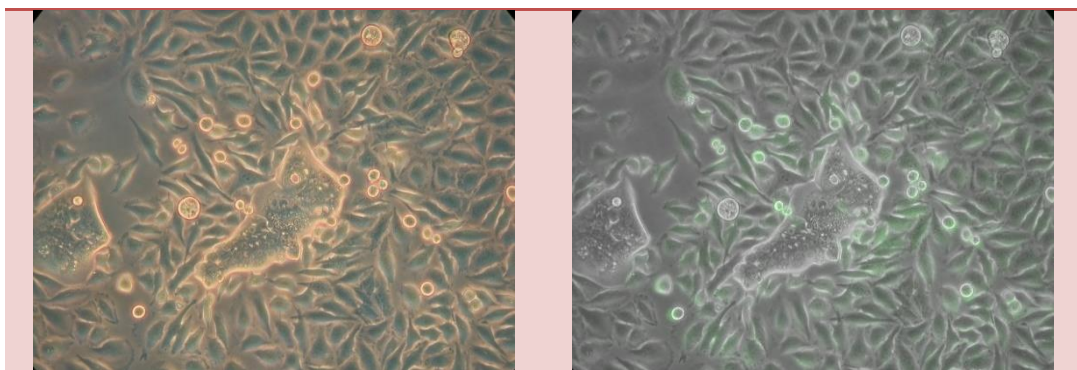
El objetivo era definir las condiciones adecuadas que permitiesen que ambos tipos celulares se encontraran en fase exponencial de crecimiento en el co-cultivo, así como maximizar el contacto directo entre las células. Por otro lado, estas condiciones debían recrear *in vitro*, unas condiciones en el rango de lo descrito en tumores pancreáticos humanos *in vivo*.

Como se puede observar en la Figura 23 y en la Figura 24, los resultados de esta optimización demostraron que la mejor combinación para obtener resultados comparables para las dos líneas tumorales reunía las siguientes características:

- una *ratio* de siembra 50:50 (línea tumoral : fibroblastos),
- las células pancreáticas son subcultivadas 72h antes de la adición de los fibroblastos,
- medio RPMI suplementado con 10% FBS,
- tiempo óptimo de co-cultivo de 72h.

En estas condiciones, la confluencia final de células en el co-cultivo es de un 80% aproximadamente, y la *ratio* final entre células tumorales y fibroblastos 20:80, comparable a la proporción descrita *in vivo* (48).

Co-cultivo de Capan-1 y LC5-GFP



Co-cultivo de PL45 y LC5-GFP

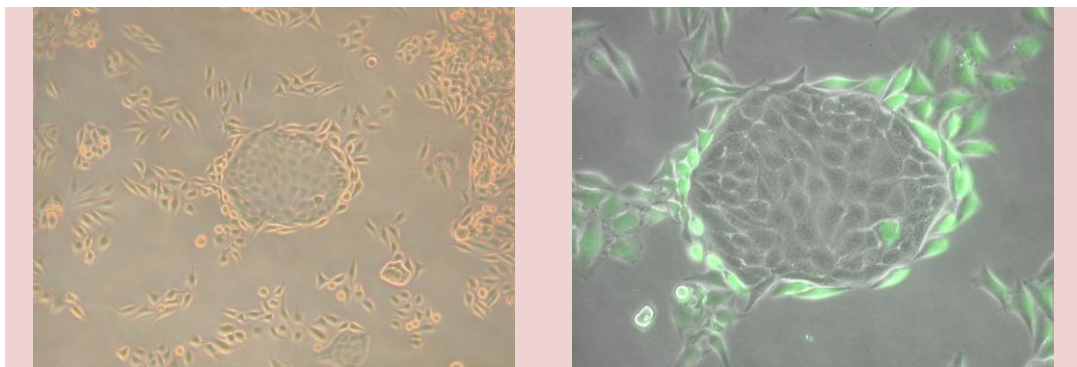


FIGURA 24. MICROFOTOGRAFÍAS DE LOS CO-CULTIVOS EN LAS CONDICIONES ÓPTIMAS

Las poblaciones celulares se aislaron del co-cultivo por *cell sorting* en función de la expresión de GFP y la incorporación de yoduro de propidio para la exclusión de células muertas, según la Figura 25.

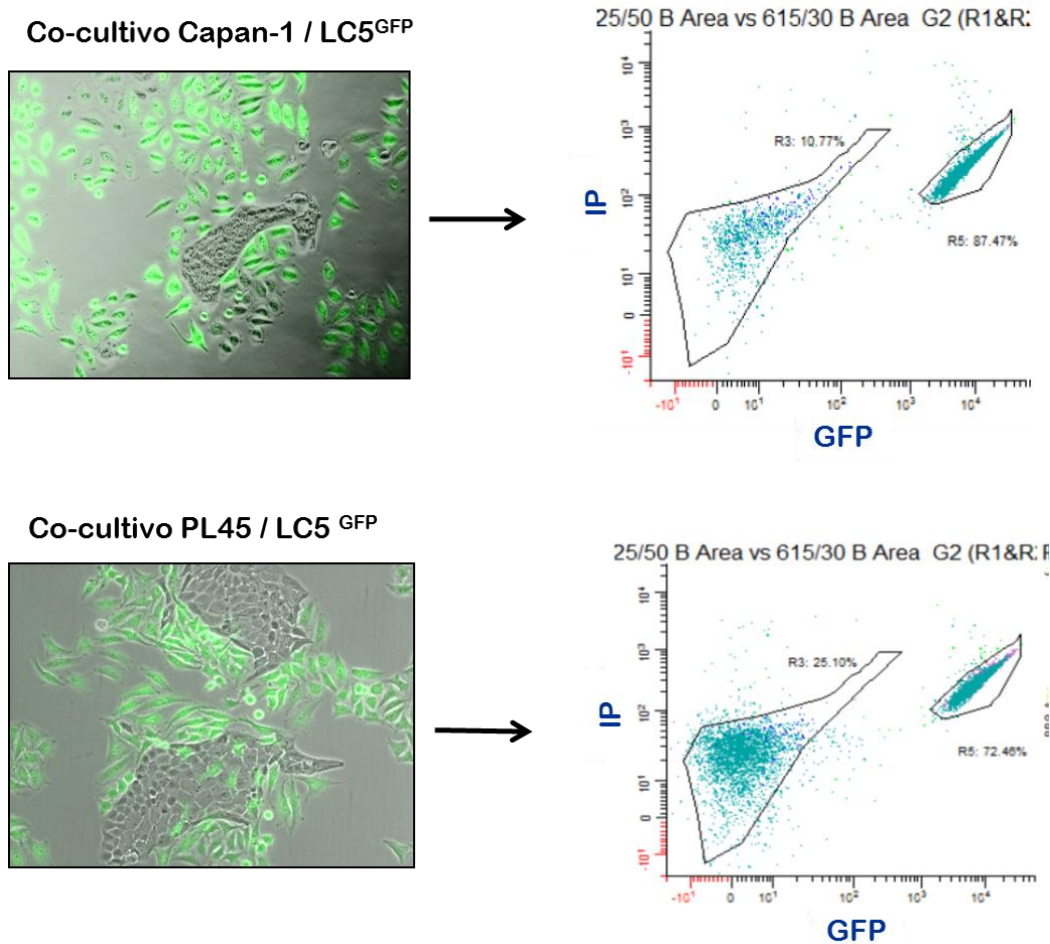


FIGURA 25. FACS PARA LA SEPARACIÓN CELULAR (SORTING) DE LOS CO-CULTIVOS.

GFP: proteína verde fluorescente (fibroblastos LC5)
IP: Ioduro de propidio (marca células muertas)

Debido a los porcentajes de cada tipo celular que constituyen los co-cultivos directos establecidos en este estudio (fibroblasto: célula tumoral, 80:20) y a los requerimientos de cantidad de proteína necesaria para la realización de los estudios proteómicos (DIGE), se estimó necesario el aislamiento y separación de aproximadamente 20×10^6 células tumorales en cada una de las condiciones estudiadas. Para obtener este número de células se realizaron siembras de co-cultivo independientes, que

fueron reunidas en un único *pool* antes de la separación de los tipos celulares en el Sony Synergy Cell Sorter.

7.2. ESTUDIOS FUNCIONALES DE MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR.

Los experimentos que se describen a continuación fueron diseñados para el estudio de la migración e invasión celular, tanto de las células tumorales pancreáticas como de los fibroblastos. Estos eventos están relacionados con la capacidad de invasión de otros tejidos u órganos y la facultad de iniciar procesos metastásicos. Al mismo tiempo, estos experimentos nos permiten estudiar las interacciones que tienen lugar entre los distintos tipos celulares que forman parte del co-cultivo y su influencia mutua.

7.2.1. Ensayos de cierre de herida o cicatrización.

7.2.1.1. *Scratch assay*.

Antes de iniciar la experimentación, se obtuvieron los medios condicionados de las líneas tumorales Capan-1 y PL45, así como de los fibroblastos LC5. Las células se cultivaron en el medio de crecimiento habitual y cuando llegaron a semiconfluencia, el medio fue sustituido por RPMI suplementado con 0,5% de FBS. Los secretomas fueron recogidos a las 48 horas del establecimiento del cultivo privado de suero.

La línea tumoral Capan-1 se cultivó a una densidad de 4×10^5 células por pocillo, en una multiplaca de 12 pocillos. Cuando se adhirieron las células, se sustituyó el medio por el secretoma de los fibroblastos LC5 obtenido anteriormente, se realizó la herida con una punta de micropipeta y se realizaron fotografías a 0, 24, 48 y 72 horas. Se sembraron pocillos control con el medio de crecimiento habitual.

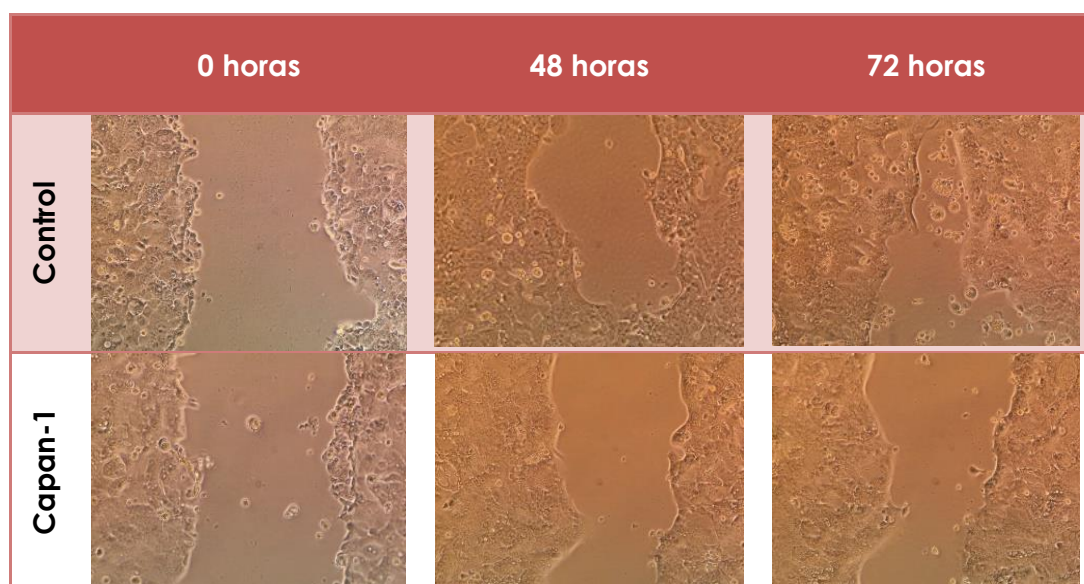


FIGURA 26. LÍNEA TUMORAL CAPAN-1 CULTIVADA CON EL SECRETOMA DE FIBROBLASTOS LC5 (0,5% FBS).

La línea tumoral Capan-1 es de crecimiento lento y, como se observa en la Figura 26, no se observa cierre de la herida tras 72 horas de examen. El cierre no se produce ni en los pocillos control ni en los pocillos en los que se han crecido las células con el secretoma de fibroblastos. El pequeño cierre que se puede ver a lo largo del tiempo es debido a proliferación celular.

La línea tumoral PL45 se creció a una densidad de 1×10^5 células por pocillo en una multiplaca de 12 pocillos. Cuando se adhirieron se sustituyó el medio por el secretoma de los fibroblastos LC5 obtenido anteriormente. La experimentación se realizó del mismo modo que para la línea Capan-1

Como puede observarse en la Figura 27, la herida se cierra entre las 48 y 72 horas. No obstante no observamos migración ni polarización celular. La herida se cierra por proliferación de la línea tumoral crecida con el secretoma de los fibroblastos. En cambio, en los pocillos control, crecidos con medio fresco, a las 24 horas ya se puede observar el cierre de la herida.

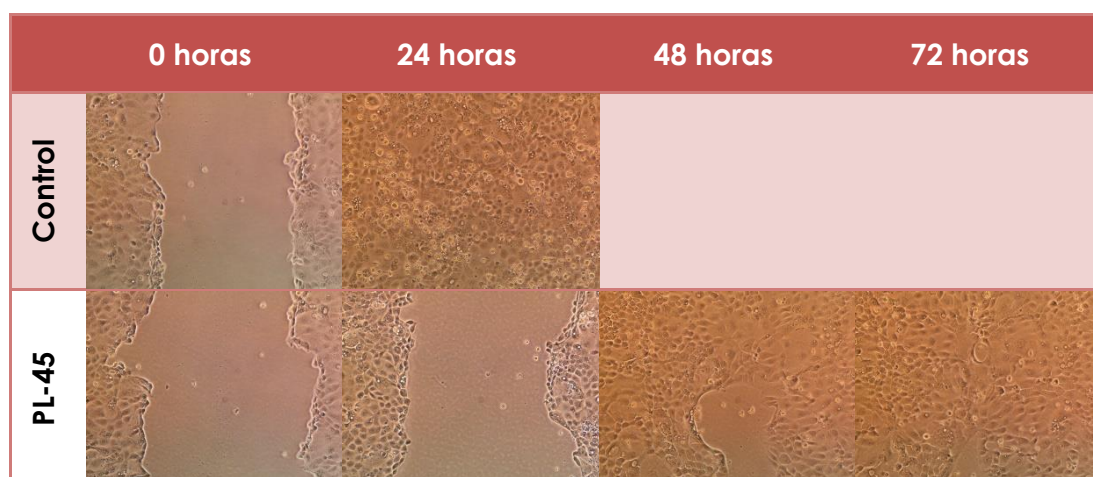


FIGURA 27. LÍNEA TUMORAL PL45 CULTIVADA CON EL SECRETOMA DE FIBROBLASTOS LC5 (0,5% FBS).

De modo similar a la experimentación realizada con las líneas tumorales de páncreas, se llevó a cabo el ensayo de “cierre de herida y cicatrización” con la línea de fibroblastos LC5. En este caso, los fibroblastos se crecieron con el secretoma de las líneas tumorales. Los resultados obtenidos a distintos tiempos quedan reflejados en la Figura 28.

Como se puede observar, la herida se cierra en los pocillos control a las 48 horas, no se aprecia migración de células y el cierre es debido principalmente a la proliferación celular desde los bordes de la herida. En cambio, cuando son cultivados con los medios condicionados de las líneas tumorales, es de destacar el movimiento de los fibroblastos que tiene lugar. En el caso del secretoma de Capan-1, se puede ver como los fibroblastos se separan del borde de la herida, se polarizan y migran hacia el centro de la misma. Estos eventos se aprecian muy pronto, a las 24 horas del establecimiento del cultivo en estas condiciones. Cuando los fibroblastos se cultivan con el secretoma de la línea tumoral PL45, podemos apreciar también una cierta polarización y migración de fibroblastos hacia el centro de la herida, aunque de una manera más sutil

al principio, haciéndose más evidente con el paso del tiempo, y apreciándose más claramente a las 48 horas de establecimiento del cultivo.

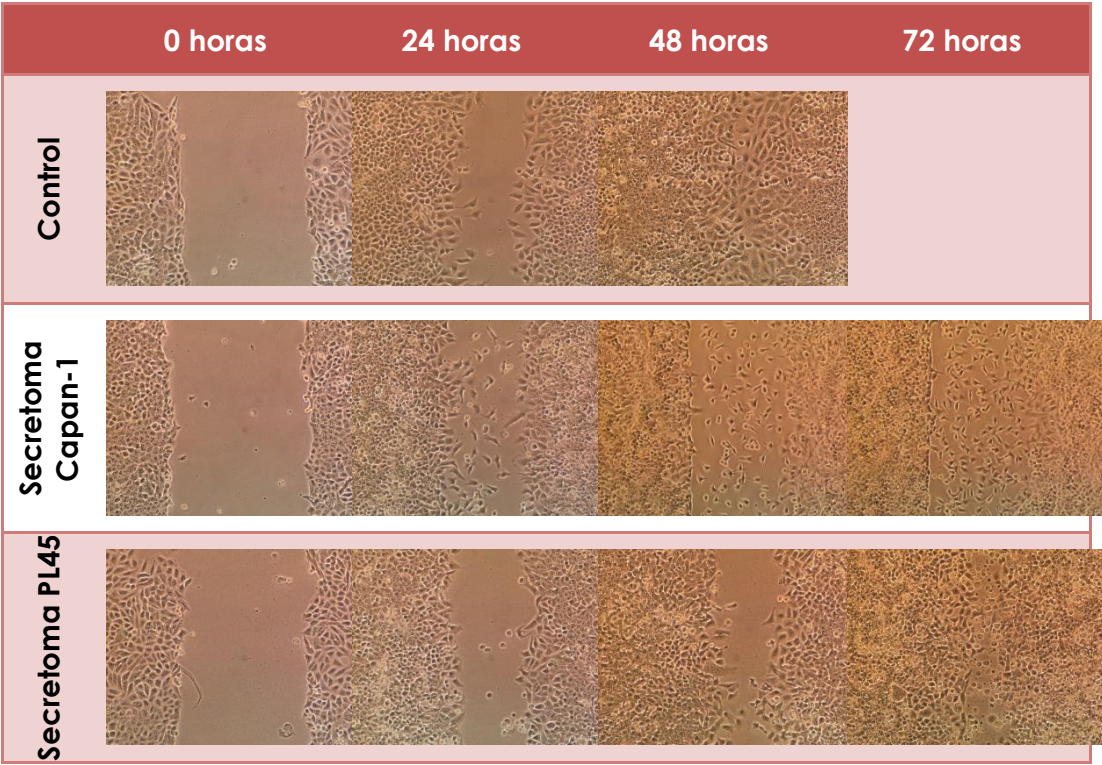


FIGURA 28: FIBROBLASTOS LC5 CULTIVADOS CON EL SECRETOMA DE LAS LÍNEAS TUMORALES CAPAN-1 O PL45 (0,5% FBS).

En la Figura 29, se puede apreciar en detalle los eventos de polarización y migración que se han descrito anteriormente.

Una vez realizados los experimentos de cierre de herida con las líneas celulares sembradas de manera individual, y teniendo en cuenta los efectos de activación observados en la línea de fibroblastos cuando era cultivada con el medio condicionado de Capan-1, se decidió realizar los mismos experimentos pero en el modelo de co-cultivo de Capan-1 y LC5 que hemos descrito en apartados anteriores.

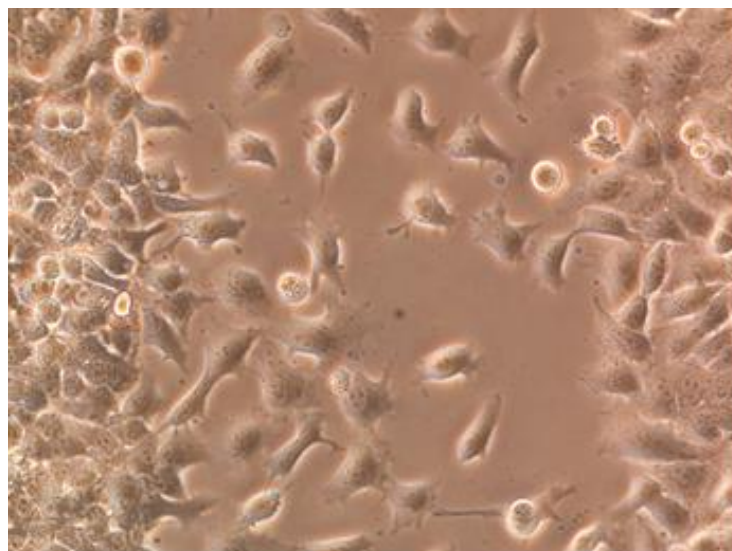


FIGURA 29. *SCRATCH ASSAY*: DETALLE DE LA MIGRACIÓN DE FIBROBLASTOS CULTIVADOS CON EL SECRETOMA DE CAPAN-1, A LAS 48 HORAS (20x).

Los resultados obtenidos quedan expuestos en las Figuras que aparecen a continuación (Figura 30, Figura 31, Figura 32).

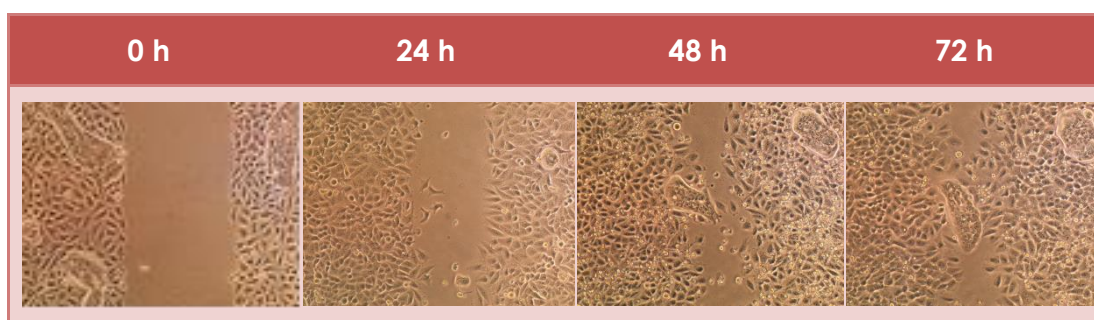


FIGURA 30. CO-CULTIVO DIRECTO CAPAN-1 / FIBROBLASTOS LC5

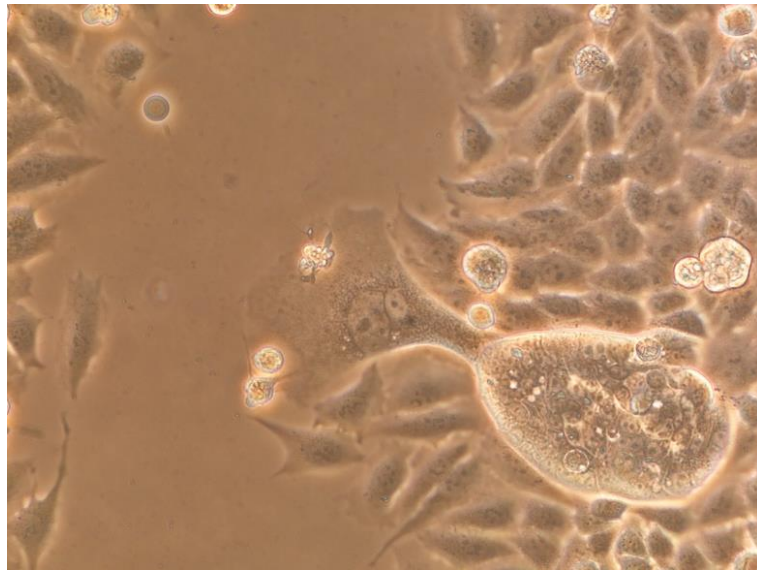


FIGURA 31. CO-CULTIVO DIRECTO CAPAN-1-FIBROBLASTOS LC5, A LAS 24 HORAS DE LA "HERIDA".

Detalle en el que se Pueden Ver las Células Polarizadas, con Protrusiones Citoplasmáticas Dirigidas hacia el Centro de la Herida.

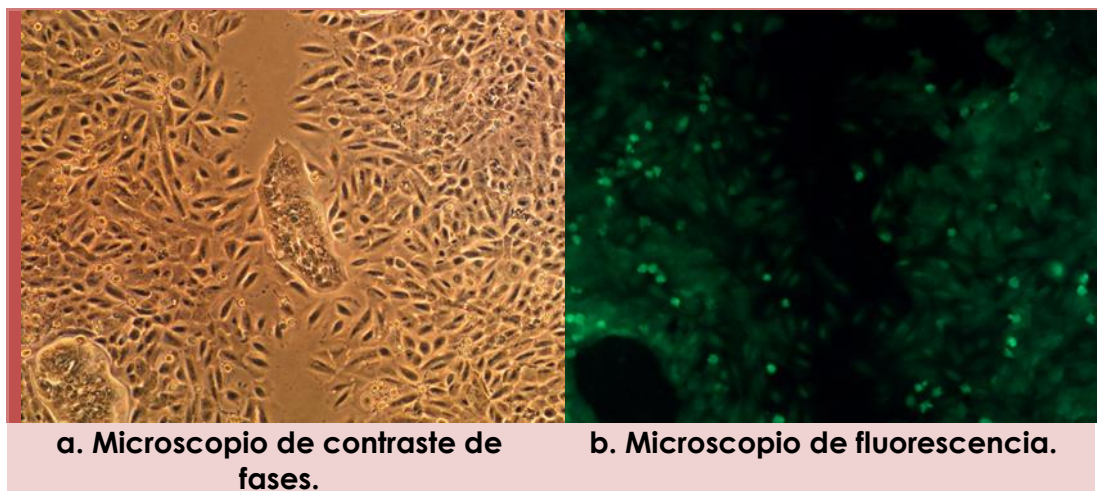


FIGURA 32. DETALLE DE LA MIGRACIÓN DE CO-CULTIVOS CAPAN-1-FIBROBLASTOS LC5-GFP+, A LAS 72 HORAS.

7.2.1.2. Ensayos en cámaras de cultivo con insertos.

Continuando con los experimentos de migración en nuestro modelo celular, decidimos abordarlos utilizando los insertos Ibidi para cultivos (detallado en 6.2.1.2. Ensayos en cámaras de cultivo con *inserto*.). En un lado del inserto se sembraron las líneas tumorales pancreáticas, mientras que en el otro lado se sembraron un número similar de fibroblastos. Como control realizamos los mismos ensayos pero colocando a ambos lados del inserto la misma línea celular.

Los resultados quedan expuestos en las figuras que aparecen a continuación (Figura 33, Figura 34, Figura 35).

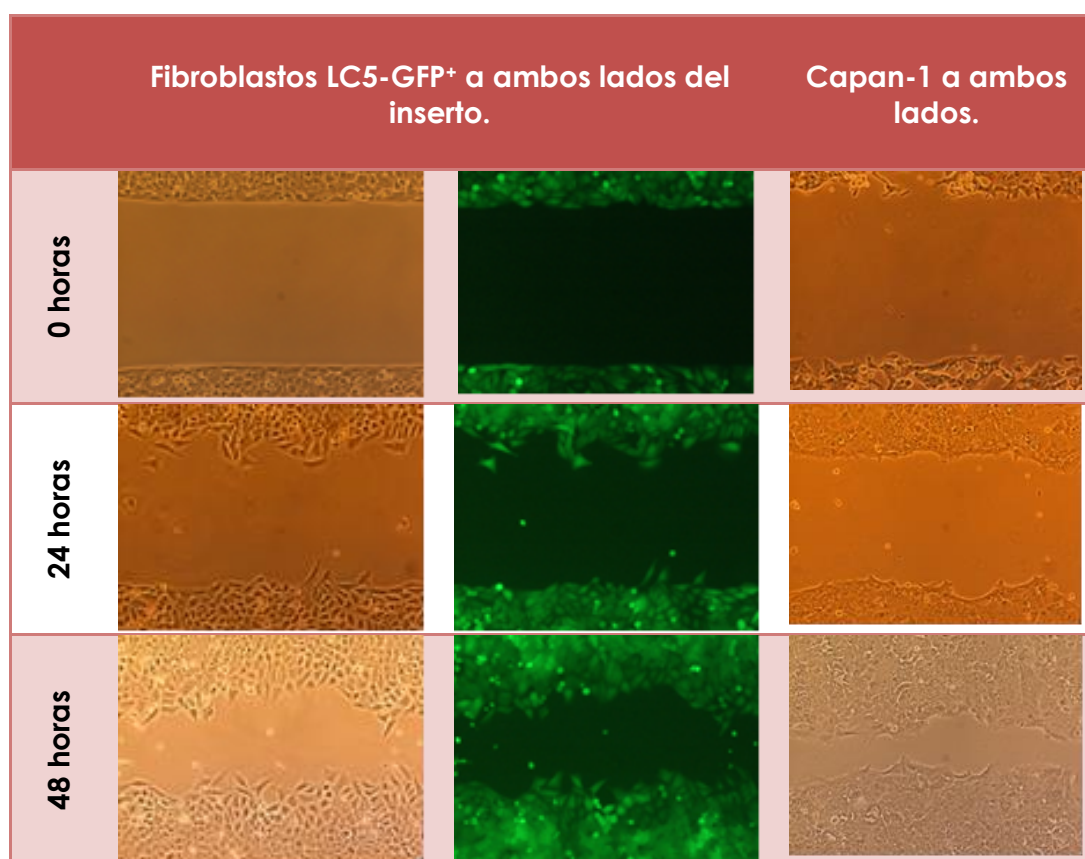


FIGURA 33. MIGRACIÓN CELULAR EN CÁMARAS DE CULTIVO CON INSERTOS IBIDI: CONTROLES

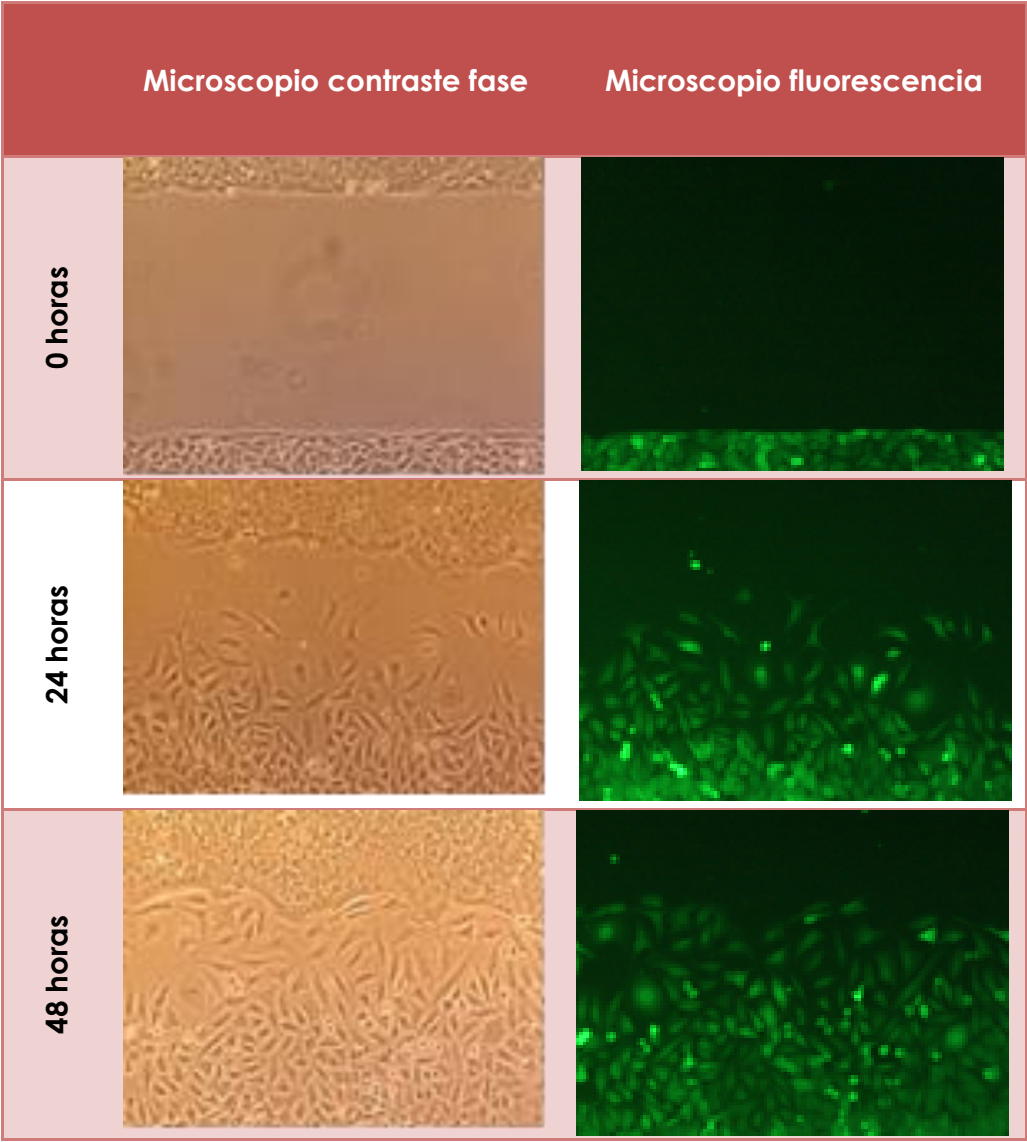


FIGURA 34. MIGRACIÓN CELULAR EN CULTIVOS CON INSERTO IBIDI: FIBROBLASTOS LC5-GFP⁺ (PARTE INFERIOR) Y CÉLULAS TUMORALES CAPAN-1 (PARTE SUPERIOR).

Como se puede observar en la Figura 34, los fibroblastos LC5-GFP⁺, bajo la influencia de las células tumorales pancreáticas Capan-1, se activan y movilizan más rápidamente que cuando se cultivan solos (Figura 33), volviéndose activos y adquiriendo mayores capacidades de movilización y migración. A las 48 horas del establecimiento del cultivo, los fibroblastos son mayoritariamente los que invaden y cierran la “herida”. Por otro lado, las células tumorales Capan-1 también proliferan más rápidamente bajo

la influencia de los fibroblastos que cuando se sitúan solas a ambos lados del inserto.

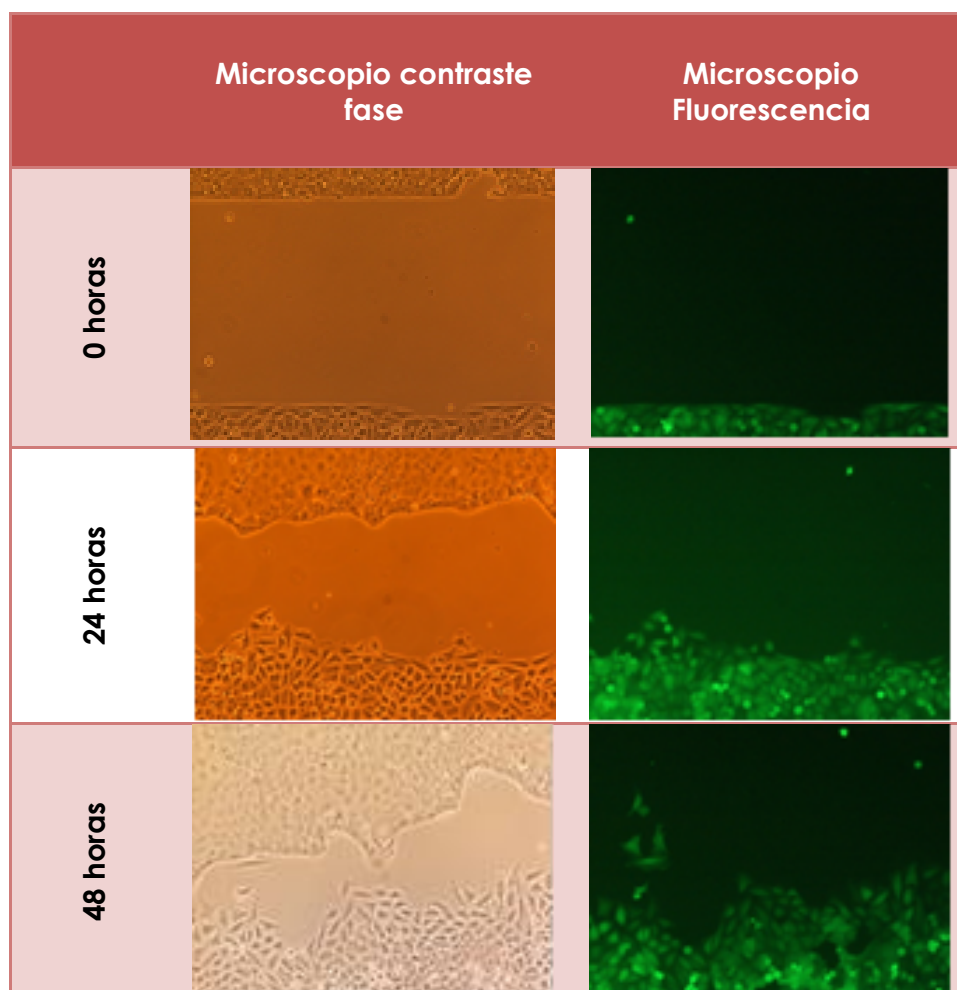


FIGURA 35. MIGRACIÓN CELULAR EN CULTIVOS CON INSERTOS IBIDI: FIBROBLASTOS LC5-GFP+ (PARTE INFERIOR) Y CÉLULAS TUMORALES PL45 (PARTE SUPERIOR).

En cambio, tal y como se refleja en la Figura 35, no observamos el mismo comportamiento entre la línea tumoral pancreática PL45 y los fibroblastos LC5. Ambas líneas celulares proliferan a lo largo del tiempo, invadiendo y cerrando la “herida” por igual. La influencia entre ambas líneas celulares es mutua, los fibroblastos se activan invadiendo la “herida”, aunque quizá menos activamente que cuando eran cultivados con la línea Capan-1,

no obstante el efecto se ve compensado por una mayor proliferación de las células PL45.

7.2.2. Ensayos de migración e invasión celular.

Con estos experimentos pretendemos validar la capacidad de migración e invasión de las células tumorales pancreáticas cuando se ven influidas por la presencia de los fibroblastos circundantes. Estos ensayos se llevaron a cabo con placas Transwell, tal y como se describe en 6.2.2. Ensayos de migración - invasión celular. (Materiales y Métodos).

Para la realización de estos experimentos sembramos en el reservorio superior de las placas Transwell 5×10^4 células de cada una de las líneas tumorales, mientras que en el reservorio inferior se sembraron 4×10^4 fibroblastos LC5, como elemento atrayente. Como experimento control se sembró el mismo número de células tumorales en los compartimentos superiores, mientras que en el inferior se colocó medio de crecimiento RPMI suplementado con 10% de FBS como quimioatrayente.

Tras 24 horas en estas condiciones, se procedió a fijar, permeabilizar y teñir la membrana, para proceder al recuento de las células tumorales que migran en estas condiciones y a las que les podemos atribuir capacidad invasiva. Se realizaron fotografías de las membranas antes y después de proceder al limpiado de células de la superficie superior de la membrana y que se exponen a continuación.

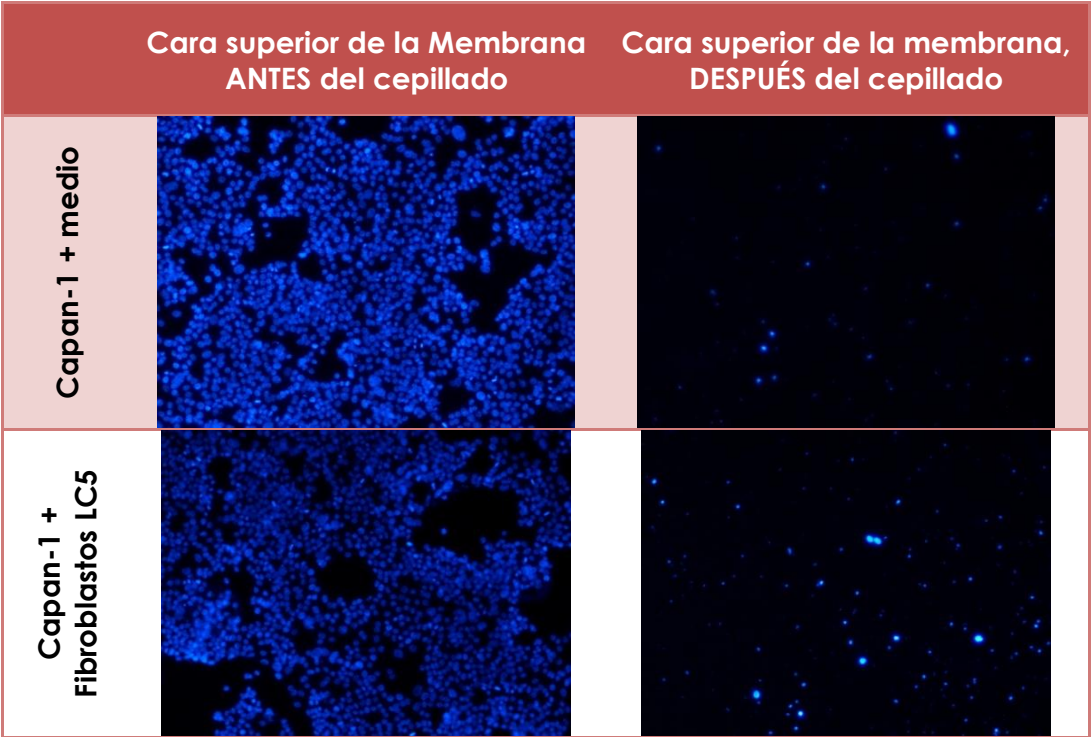


FIGURA 36. MIGRACIÓN/INVASIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CAPAN-1 (TRANSWELL).

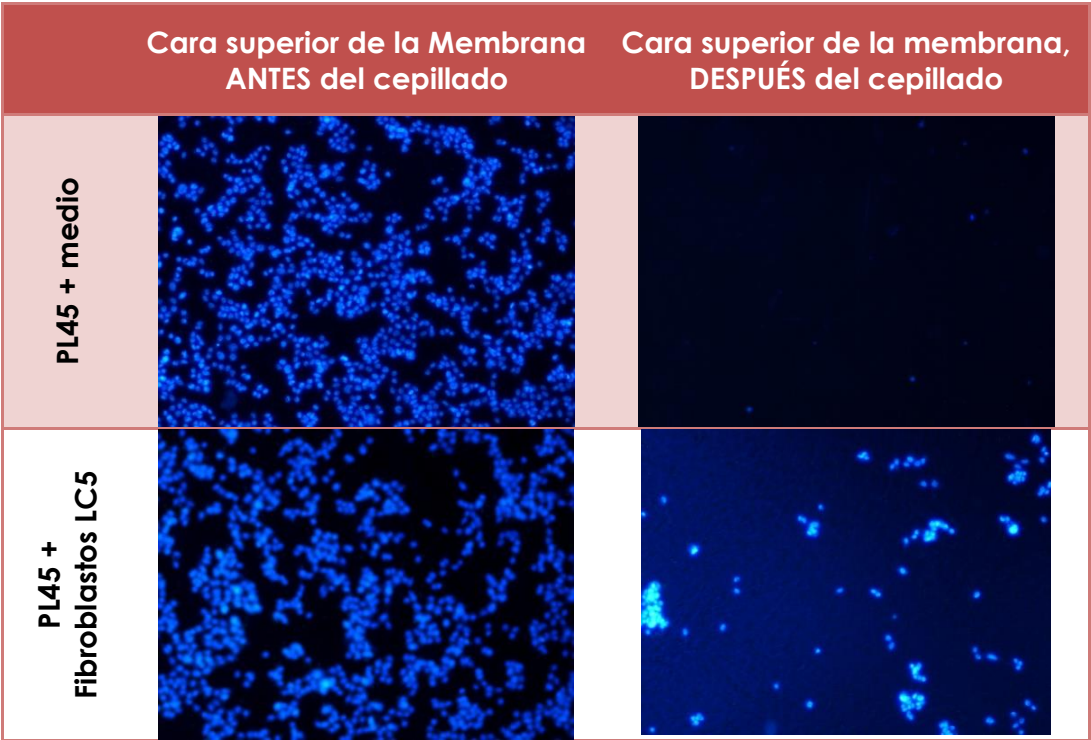


FIGURA 37. MIGRACIÓN/INVASIÓN DE CÉLULAS PL45 (TRANSWELL).

El experimento se realizó por triplicado y en tres ocasiones de manera independiente. Se llevó a cabo el recuento de las células tumorales que migraban a través de la membrana y se calculó el valor medio de todos los experimentos. Considerando como 100 el número de células que migraban cuando se ponía como quimio-atrayente el medio de crecimiento con 10% de FBS, se calculó el porcentaje correspondiente a las células tumorales que migraban cuando se situaban los fibroblastos en el compartimento inferior.

Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Figura 38.

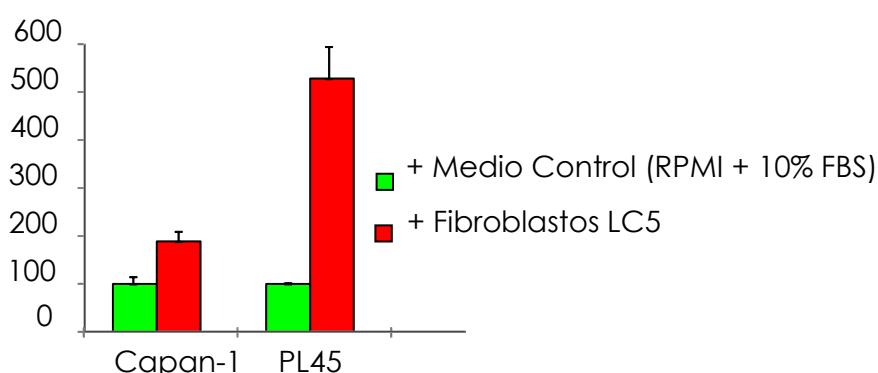


FIGURA 38. CUANTIFICACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES (TRANSWELL)

Con estos resultados, quedan validados los experimentos anteriores en los que podíamos ver como las células tumorales migran más y tienen mayor capacidad invasiva cuando se ven influidas por fibroblastos situados en su proximidad.

7.3. MODIFICACIONES MOLECULARES GLOBALES EN FIBROBLASTOS Y TUMOR.

Las observaciones de los estudios previos, en los que se comprueba que la presencia de células tumorales puede modificar el aspecto y motilidad

de los fibroblastos, y viceversa, condujeron a la hipótesis de que los fibroblastos se activan en el co-cultivo. Como se describió en la introducción, la transformación de los fibroblastos cuando se activan por el tumor supone cambios en la expresión de varias proteínas. Se seleccionaron dos: la α -SMA, marcador de transformación a miofibroblasto, y el KGF (Factor de crecimiento de queratinocitos), marcador de la capacidad de cooperar con el crecimiento del tumor.

7.3.1. Inducción de la expresión fibroblástica de α -SMA.

Para confirmar que los fibroblastos LC5 utilizados en este estudio tenían las características propias de CAFs en nuestro modelo experimental, decidimos llevar a cabo una tinción inmunofluorescente de α -SMA en las diferentes condiciones experimentales y modelos diseñados. Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Figura 39.

Como podemos observar, los fibroblastos LC5-GFP⁺ que no han tenido contacto con células tumorales no expresan α -SMA (tercera fila de la Figura 39). Tampoco es expresado este marcador por las células tumorales Capan-1 y PL45 (primera y segunda filas de la Figura 39). No obstante, en los co-cultivos de células tumorales pancreáticas con fibroblastos LC5-GFP⁺ aparece tinción positiva para el marcador de α -SMA en estos fibroblastos. Es más, los fibroblastos LC5-GFP⁺ expresan α -SMA, adquiriendo el fenotipo de CAFs, incluso cuando han crecido con el secretoma o medio condicionado de las células tumorales, en ausencia de interacción directa con las mismas.

Dados los resultados expuestos anteriormente, podemos confirmar que los fibroblastos LC5 se activan y se transforman en CAFs, cuando son sometidos a la influencia, tanto directa como indirecta, de las células tumorales pancreáticas utilizadas en este estudio.

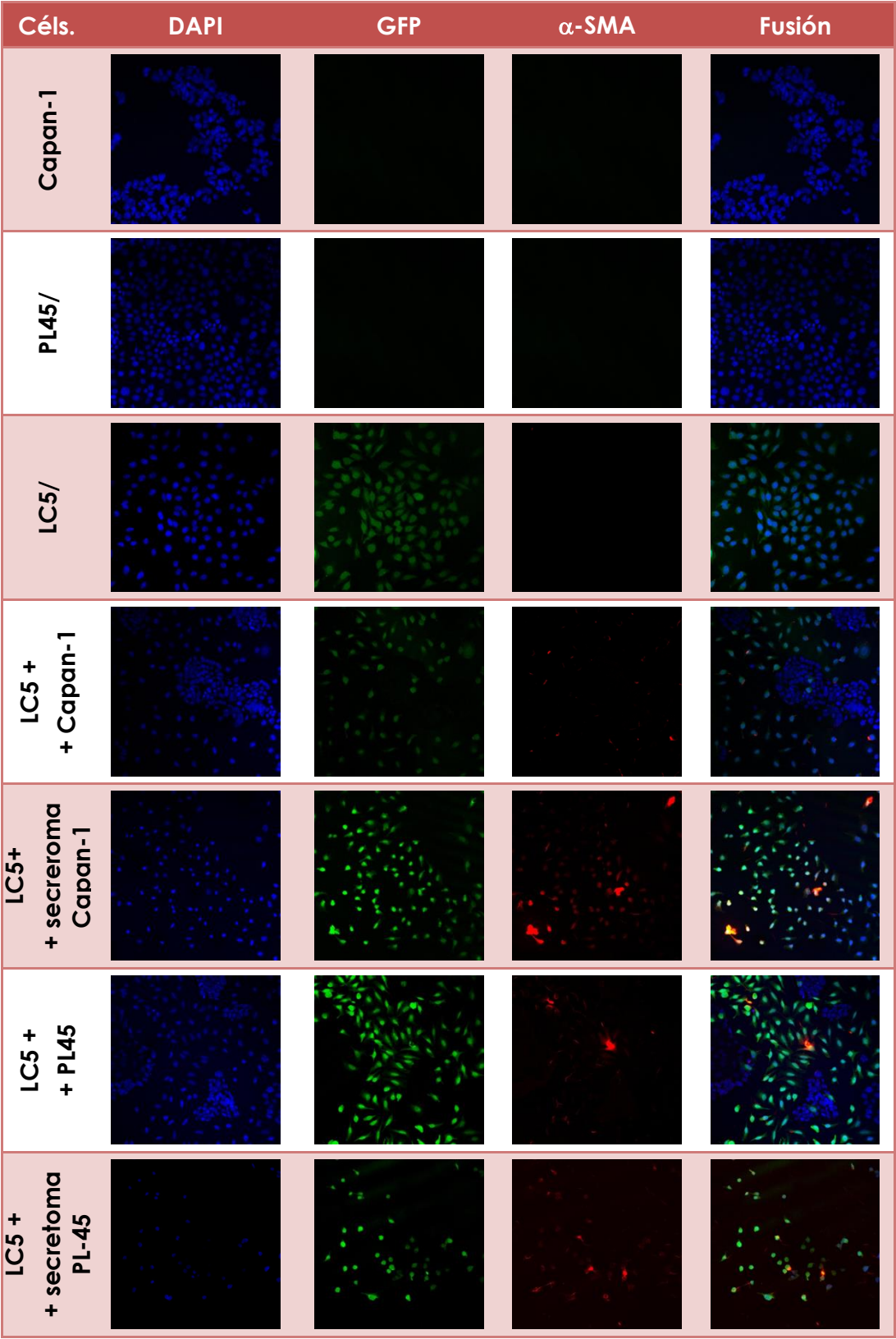


FIGURA 39. ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS LC5-GFP⁺ EN CO-CULTIVOS

7.3.2. Inducción de la secreción de FGF-7/KGF (Factor de Crecimiento de Queratinocitos).

Para demostrar que los fibroblastos utilizados en nuestro estudio se transforman en fibroblastos asociados a tumor, con sus peculiares características, se decidió cuantificar la expresión de KGF en los mismos, cuando eran crecidos aisladamente y cuando se crecían en co-cultivos con las líneas tumorales pancreáticas.

Para ello se prepararon tres cultivos control, con cada una de las estirpes celulares por separado, y dos co-cultivos experimentales. Se sembraron 10^5 fibroblastos LC5 en placas F25, en su medio de cultivo habitual, pero fueron privados de suero (1% de FBS) durante las 72 horas previas a la realización de la experimentación, para evitar cualquier tipo de estímulo adicional. Igualmente fueron cultivados 5×10^5 células de las líneas tumorales pancreáticas Capan-1 y PL45, en las mismas condiciones descritas para los fibroblastos. Las placas de co-cultivo se prepararon sembrando 10^5 células LC5 conjuntamente con, bien 5×10^5 células Capan-1 ó 5×10^5 células PL45, de manera similar al modelo de co-cultivo que diseñamos en este trabajo, pero crecidas con 1% de FBS.

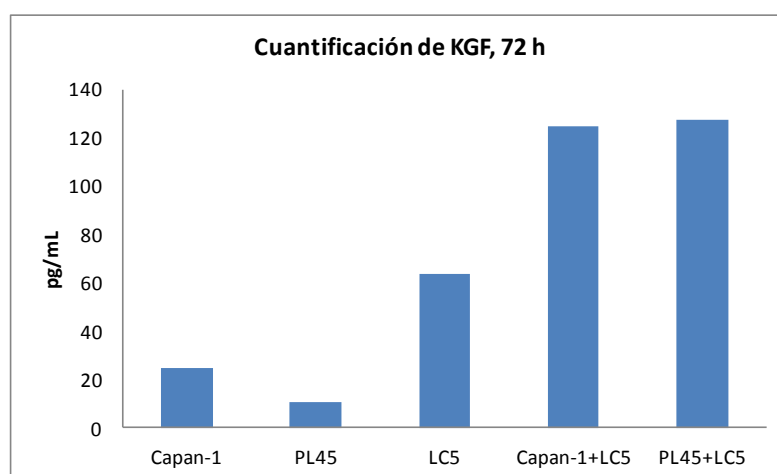


FIGURA 40. INCREMENTO DE KGF INDUCIDO POR EL CO-CULTIVO.

Tras 72 horas en estas condiciones, se procedió a la realización del ELISA para la cuantificación de la expresión de KGF en los sobrenadantes de los cultivos anteriormente descritos. Los resultados quedan reflejados en la Figura 40.

7.3.3. Pérdida de expresión de E-Cadherina en el tumor.

Como se describe en Material y métodos, se realizó un estudio de la expresión de E-cadherina utilizando los extractos proteicos remanentes de los *pellet* celulares tras reservar para los estudios de proteómica. La cantidad de proteína de la línea tumoral PL45 no fue suficiente para realizar estudios óptimos mediante Western Blot. La Figura 41 muestra los resultados con la línea Capan-1. Se muestra una disminución de la expresión de E-Cadherina a las 48 h de co-cultivo directo con fibroblastos LC5.



FIGURA 41. EXPRESIÓN DE E-CADHERINA EN LA LÍNEA CAPAN-1 (WESTERN BLOT).

A: Mono-cultivo; B: Co-Cultivo con LC5; C: Cultivo con Secretoma LC5

7.4. MODIFICACIONES PROTEÓMICAS DURANTE LA INTERACCIÓN ENTRE FIBROBLASTOS Y CÉLULAS TUMORALES.

Se elaboraron muestras conjuntas de las diferentes condiciones de cultivos (*pools* celulares), según lo expuesto en Materiales y Métodos. Las poblaciones celulares de los co-cultivos directos se separaron por citometría de flujo con FACS, según lo descrito en 6.1.3.2. Aislamiento de las poblaciones celulares procedentes del co-cultivo. A partir de cada uno de los cultivos celulares, se obtuvieron *pellets* celulares, de los que se extrajeron las proteínas, según lo descrito en 6.4.1. Preparación de las muestras, extracción y cuantificación de proteínas. Una vez preparado el extracto proteico de los cultivos celulares, las muestras se enviaron a la Unidad de Proteómica del Parque Científico de Madrid para su análisis. Las muestras fueron procesadas hasta obtener los geles de electroforesis DIGE, según lo descrito en Materiales y Métodos (6.4. ANÁLISIS PROTEÓMICO: ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2-D).). Tras el procesamiento y análisis de los geles DIGE, se identificaron los *spots* proteicos con diferente abundancia entre las muestras estudiadas. Estos *spots* fueron posteriormente analizados por espectrometría de masas.

En este apartado describiremos los hallazgos encontrados para cada línea celular en cada condición experimental. En la Discusión se presentará un resumen de las principales funciones de las proteínas identificadas (Tabla 25).

7.4.1. Línea tumoral Capan-1.

Tras el análisis del gel DIGE se detectaron un total de **1336** *spots*. La Tabla 5 resume las diferencias observadas en los análisis realizados por parejas, que se pormenorizarán a continuación.

TABLA 5. NÚMERO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE PRESENTES EN EL GEL DE CAPAN-1

	Nº SPOTS	Decrecen	Incrementan
Capan-1 + secretoma LC5 vs Capan-1 (Capan C/Capan A)	1336	11 (0.8%)	6 (0.4%)
Co-cultivo Capan-1 + LC5 vs Capan-1 (Capan B/Capan A)		27 (2%)	36 (2.7%)
Co-cultivo Capan-1 + LC5 vs Capan-1 + secretoma LC5 (Capan B/Capan C)		42 (3.1%)	49 (3.7%)

7.4.1.1. Capan-1: Cultivo con medio condicionado de fibroblastos LC5 vs mono-cultivo. (Capan C vs Capan A).

La Figura 42 representa la distribución de los valores de abundancia de las proteínas de ambos proteomas, tras su normalización. Se considera el doble de la desviación estándar (SD) como valor a partir del cual se calcula el umbral para definir un cambio significativo. En este caso, el valor es **1.6 veces**.

- 11 spots disminuyen en Capan C respecto a Capan A representando un 0.8 % respecto al total de spots detectados.
- 6 spots aumentan, representando un 0.4%.

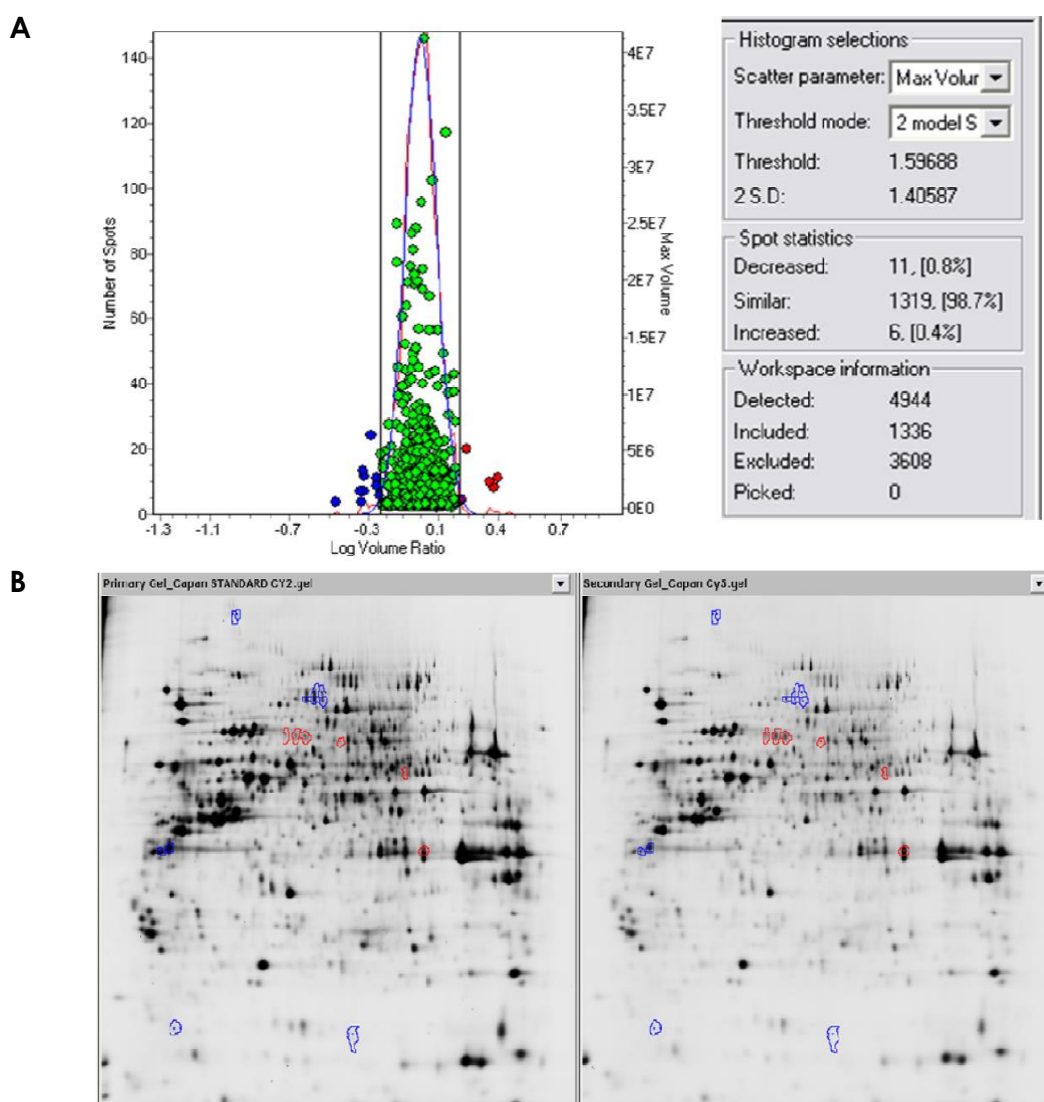


FIGURA 42. COMPARACIÓN ENTRE CAPAN-1 CULTIVADA CON SECRETOMA DE LC5 VS CAPAN-1.

- (A) Distribución normal del ratio Capan C/Capan A junto con los valores de SD y porcentajes de spots con variaciones.
- (B) Localización de los spots diferenciales, considerando 2xSD como umbral de valor de cambio. En azul se resaltan los spots que disminuyen y en rojo los que aumentan.

La lista de los spots seleccionados con las variaciones relativas de su abundancia se describe en la Tabla 1 del **Apéndice**.

Tras el análisis por espectrometría de masas de las huellas peptídicas de las proteínas problema y la consulta en la base de datos MASCOT, se identificaron 3 proteínas con diferente abundancia (Tabla 6)

TABLA 6. RELACIÓN DE PROTEÍNAS IDENTIFICADAS CUYA ABUNDANCIA VARÍA EN EL CULTIVO DE CAPAN-1 + SECRETOMA LC5 VERSUS CAPAN-1

Spot	Proteína	Diferencia	Ratio
1413	Filamina B	Disminuye	-1.94
2853	Anexina A2	Aumenta	+1.71

7.4.1.2. Capan-1: Co-cultivo con fibrobrastos LC5 vs mono-cultivo Capan-1 (Capan B vs Capan A).

Tras la normalización de los valores relativos de abundancia de los dos proteomas analizados, su distribución se representa en la Figura 43. Se considera el doble de la desviación estándar (SD) como valor a partir del cual se calcula el umbral para definir un cambio. En este caso, el valor es **1.99 veces**.

- 27 spots disminuyeron en Capan B respecto a Capan A, representando un 2 % respecto al total de spots detectados.
- 36 spots aumentaron, representando un 2.7%.

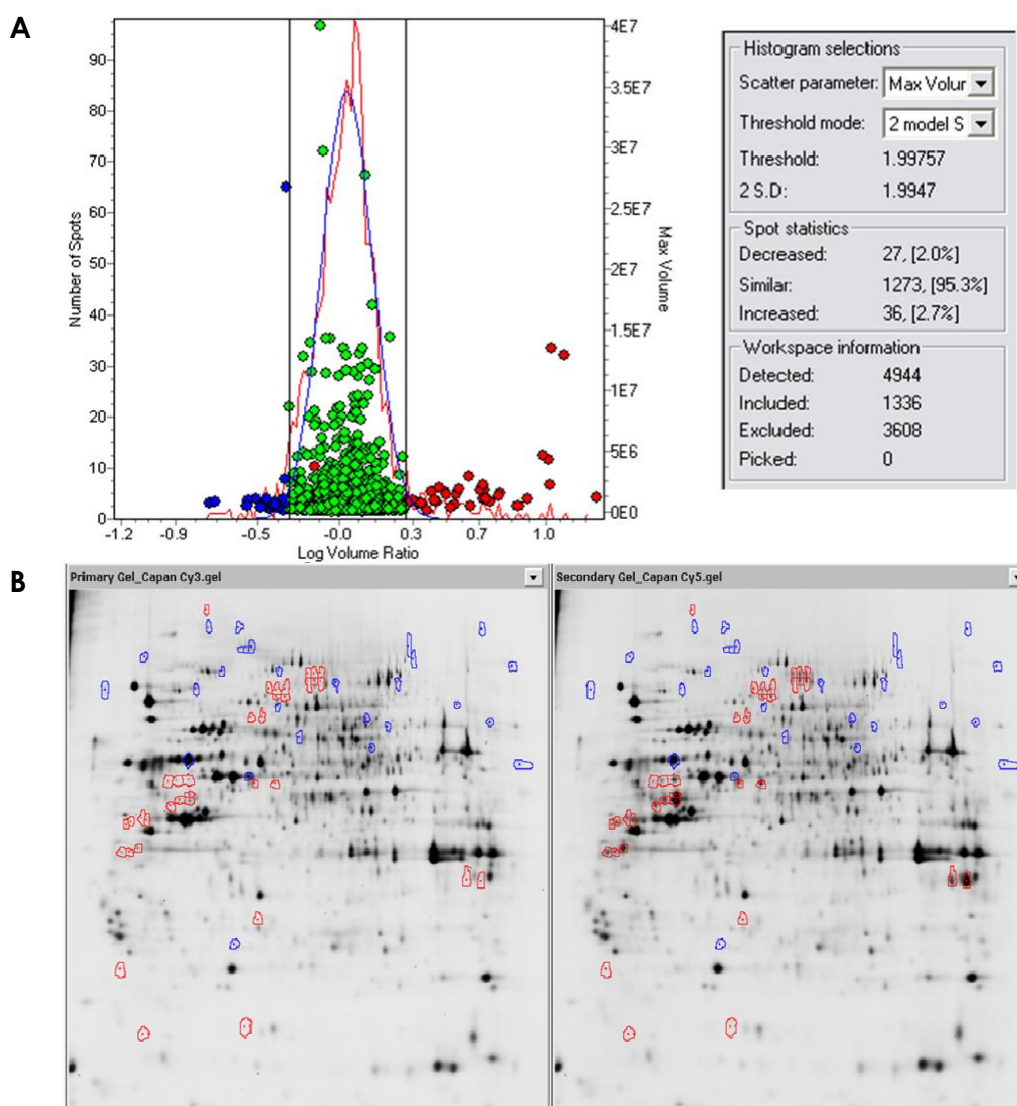


FIGURA 43.- COMPARACIÓN ENTRE PROTEOMAS DE CAPAN-1 CO-CULTIVADAS CON FIBROBLASTOS LC5 VS CAPAN 1 EN MONO-CULTIVO (CAPAN B VSA).

- (A) Distribución normal del ratio Capan B/Capan A junto con los valores de SD y porcentajes de spots con variaciones.
- (B) Localización de los spots diferenciales, considerando la SD como umbral de valor de cambio. En azul se resaltan los spots que disminuyen y en rojo los que aumentan.

El listado de los spots con diferente abundancia y su *ratio* de variación se puede consultar en la Tabla 2 del **Apéndice**.

Tras el análisis por espectrometría de masas de las huellas peptídicas de las proteínas problema y la consulta en la base de datos MASCOT, se identificaron 7 proteínas con diferente abundancia (Tabla 7)

TABLA 7. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS CUYA ABUNDANCIA DIFIERE EN CO-CULTIVOS
CAPAN-1 + LC5 FRENTE A CAPAN-1

Spot	Proteína	Variación	Ratio
1144	Filamina B	Aumento	+6.06
1223	Filamina B	Aumento	+3.21
1302	α-actinin-4	Disminución	-3.22
1642	Prelamina-A/C	Disminución	-2.36
1976	Prelamina-A/C	Disminución	-4.74
2291	HPS60 (60 kDa heat shock protein, mitochondrial)	Aumento	+11.00
3096	Anexina A2	Aumento	+10.09
3103	Anexina A2	Aumento	+11.14
3409	40S proteína ribosomal SA	Aumento	+2.41
3589	HSP β-1 (Heat shock protein β-1)	Disminuye	-2.35

7.4.1.3. Capan-1: Co-cultivo con fibroblastos LC5 vs cultivo con secretoma de fibroblastos LC5 (Capan B vs Capan C).

La Figura 44 representa la distribución de los valores normalizados de abundancia obtenidos tras comparar ambos proteomas. Se considera el doble de la desviación estándar (SD) como valor a partir del cual se calcula el umbral para definir un cambio significativo. En este caso, el valor es 1.96 veces.

- 42 spots disminuyen en Capan B respecto a Capan C representando un 3.1 % respecto al total de spots detectados.
- 49 spots aumentan, representando un 3.7%.

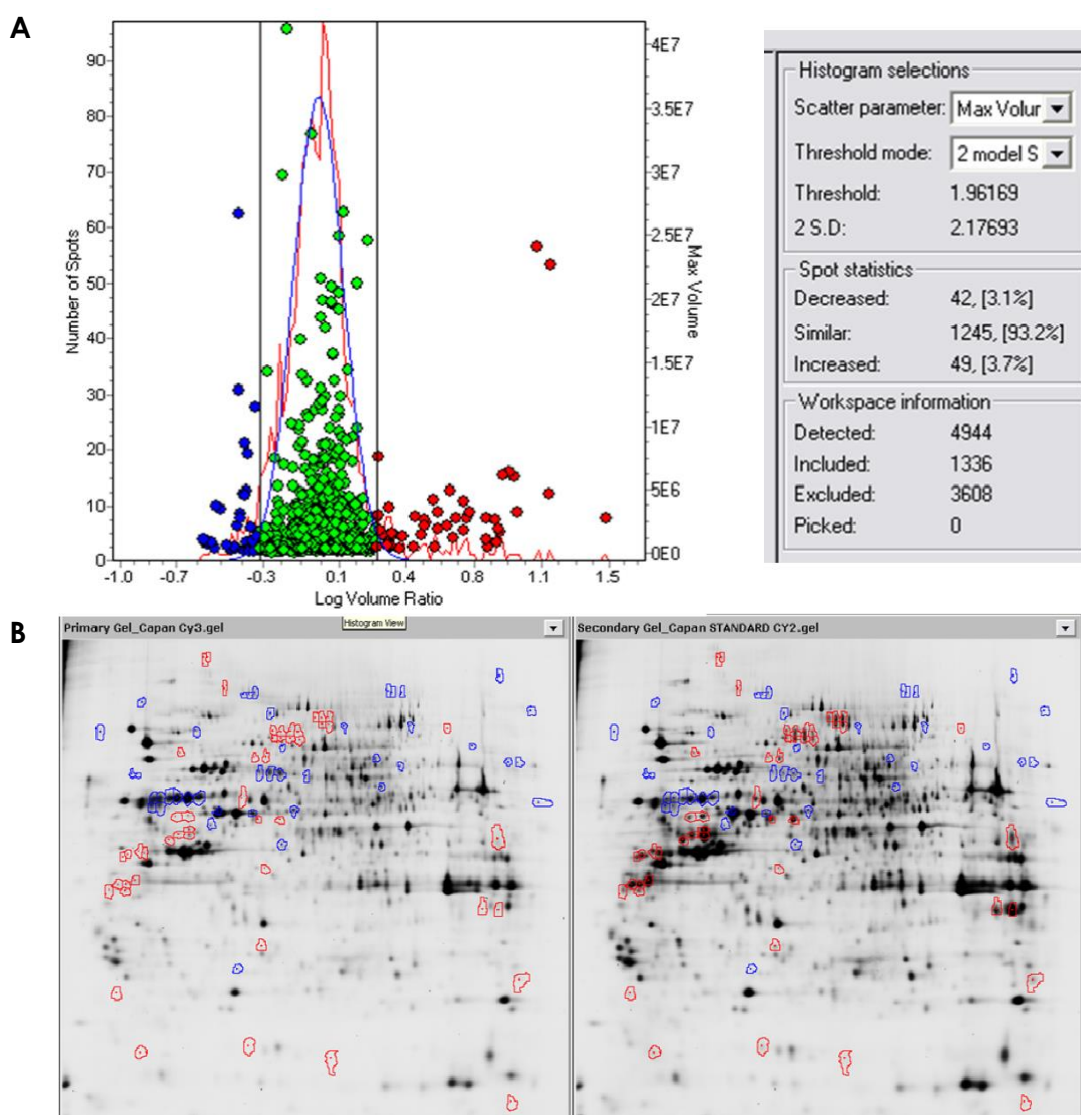


FIGURA 44. COMPARACIÓN ENTRE CO-CULTIVOS CAPAN-1 + LC5 VS CULTIVO DE CAPAN-1 CON SECRETOMA DE LC5 (CAPAN B/CAPAN C).

- (A) Distribución normal del ratio Capan B/Capan C junto con los valores de SD y porcentajes de spots con variaciones.
- (B) Localización de los spots diferenciales, considerando la SD como umbral de valor de cambio. En azul se resaltan los spots que disminuyen y en rojo los que aumentan.

El listado de los spots con diferente abundancia y su *ratio* de variación se puede consultar en la Tabla 3 del **Apéndice**.

Por necesidades de priorización, la identificación directa de los spots de esta comparación no se ha realizado. Pero algunos de los spots fueron

identificados a partir de las dos comparaciones previamente descritas, por lo que se puede construir la Tabla 8, con la abundancia relativa de dichas proteínas en las células tumorales en co-cultivo frente a condiciones de cultivo con secretoma de fibroblastos.

TABLA 8. CAPAN-1: CO-CULTIVOS (CAPAN-1 + FIBROBLASTOS LC5) VERSUS CULTIVOS (CAPAN-1) EN MEDIO CONDICIONADO (LC5): PROTEÍNAS IDENTIFICADAS CON DIFERENTE ABUNDANCIA.

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
1144	Filamina B	Incrementada	+7.79
1223	Filamina B	Incrementada	+3.48
1302	α -Actinina – 4	Disminuida	-3.64
1413	Filamina B	Incrementada	+2.38
1642	Prelamina A/C	Disminuida	-2.3
1976	Prelamina A/C	Disminuida	-3.4
2291	HSP60	Incrementada	+14.25
3096	Anexina A2	Incrementada	+8.43
3103	Anexina A2	Incrementada	+12.43
3409	40S proteína ribosomal SA	Incrementada	+2.66
3589	HSP β -1	Disminuida	-2.86

7.4.2. Línea tumoral PL45.

Tras el análisis del gel DIGE se detectaron un total de **1310** spots. La Tabla 9 resume las variaciones observadas en los análisis realizados por parejas, que se pormenorizará a continuación.

TABLA 9. NÚMERO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE PRESENTES EN EL GEL DE PL45.

	Nº SPOTS	Disminuyen	Aumentan
PL45 + secretoma LC5 vs PL45 (PL45 C/PL45 A)	1310	15(1.1%)	4(0.3%)
Co-cultivo PL45 + LC5 vs PL45 (PL45 B/PL45 A)		3(0.2%)	21(1.6%)
Co-cultivo PL45 + LC5 vs PL45 + secretoma LC5 (PL45 B/PL45 C)		15(1.1%)	47(3.6%)

7.4.2.1. PL45: cultivo con secretoma de fibroblasto LC5 vs mono-cultivo PL45 (PL45 C / PL45 A).

Se realiza la comparación de ambos proteomas. Tras la normalización de los valores de abundancia, su distribución se representa en la gráfica de la Figura 45. Se considera el doble de la desviación estándar (SD) como valor a partir del cual calcular el umbral para definir un cambio. En este caso, este umbral es 2.4 veces.

- 15 spots disminuyen en PL45 C respecto a PL45 A, representando un 1.1 % respecto al total de spots detectados.
- 4 spots aumentan, representando un 0.3 %.

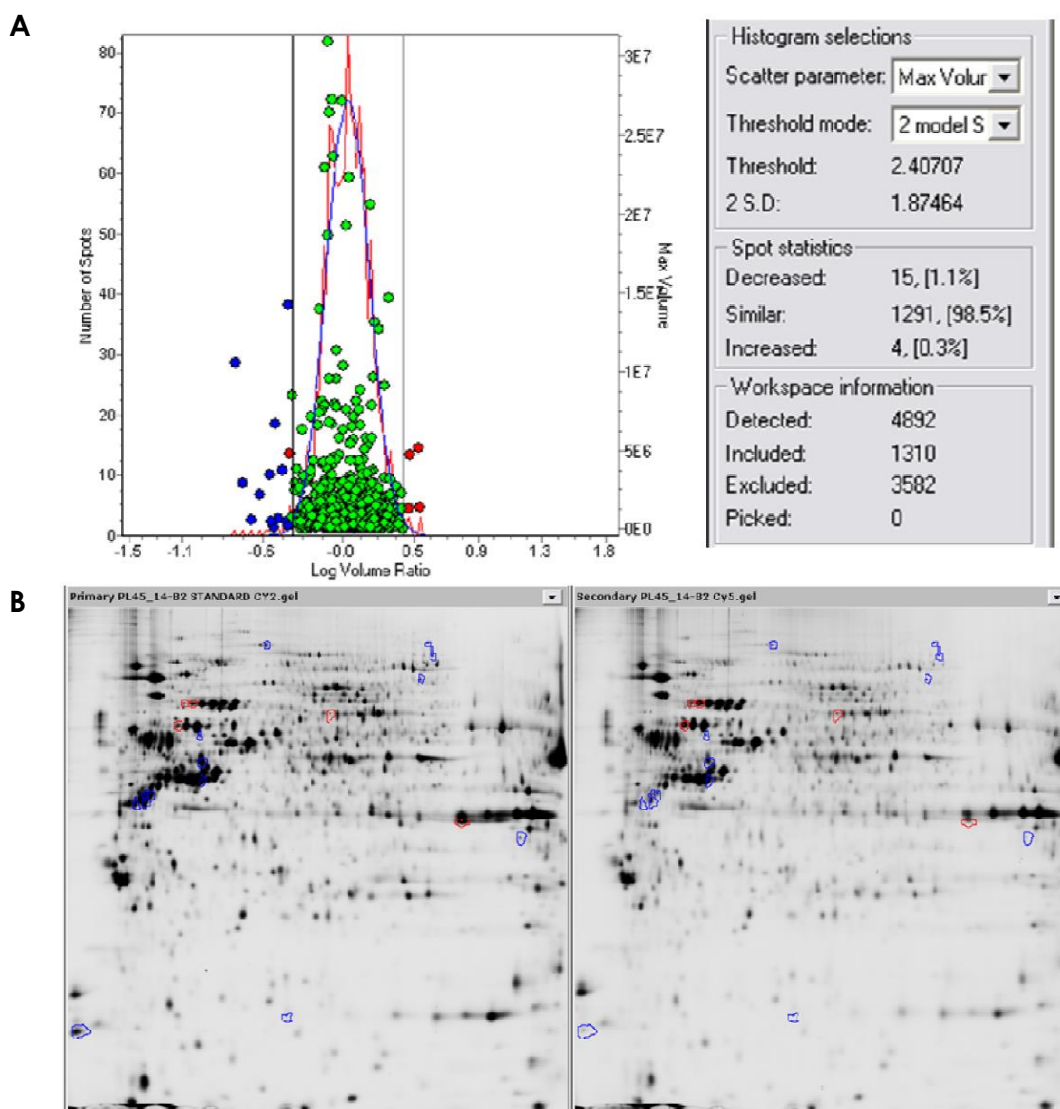


FIGURA 45. COMPARACIÓN ENTRE PL45 CULTIVADO CON SECRETOMA DE FIBROBLASTOS LC5 VS PL45 (PL45 C/PL45 A).

- (A) Distribución normal del ratio PL45 C/PL45 A junto con los valores de SD y porcentajes de spots con variaciones.
- (B) Localización de los spots diferenciales, considerando la SD como umbral de valor de cambio. En azul se resaltan los spots que disminuyen y en rojo los que aumentan.

El listado de los spots con diferente abundancia y su *ratio* de variación se puede consultar en la Tabla 4 del **Apéndice**.

Tras el análisis por espectrometría de masas de las huellas peptídicas de las proteínas problema y la consulta en la base de datos MASCOT, se identificaron 4 proteínas con diferente abundancia.

TABLA 10. PL45: PROTEÍNAS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN CULTIVOS DE PL45 CON SECRETOMA DE LC5 VS MONO-CULTIVOS DE PL45.

Spot	Proteína	Variación	Ratio
1456	Heat shock cognate 71 kDa protein	Aumento	+3.11
1462	Heat shock cognate 71 kDa protein	Aumento	+2.65
1811	HSP60 (60 kDa heat shock protein, mitochondrial)	Disminución	-2.61
2199	Actina citoplasmática 1	Disminución	-2.54
2545	Anexina A2	Disminución	-2.48

7.4.2.2. PL45: Co-cultivo con fibroblastos LC5 vs monocultivo PL45 (PL45 B / PL45 A).

Se realiza la comparación de ambos proteomas. Tras la normalización de los valores de abundancia, su distribución se representa en la gráfica de la Figura 46. Se considera el doble de la desviación estándar (SD) como valor a partir del cual calcular el umbral para definir un cambio. En este caso, el umbral es 2.88 veces.

- 3 spots disminuyen la abundancia en PL45 B respecto a PL45 A, representando un 0.2 % respecto al total de spots detectados.
- 21 spots aumentan en abundancia, representando un 1.6 %.

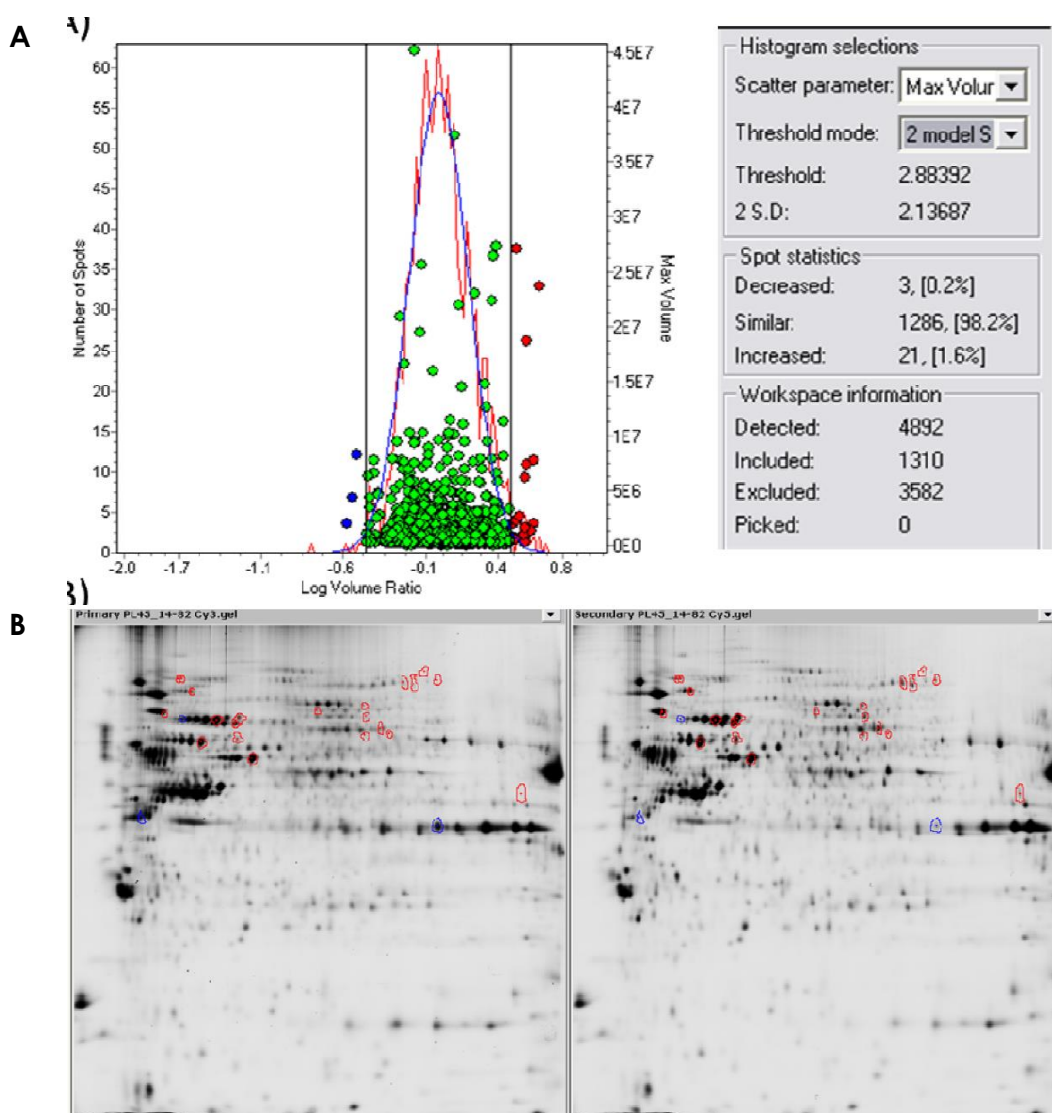


FIGURA 46. PL45: CO-CULTIVO CON LC5 VS MONO.CULTIVO (PL45 B / PL45 A).

- (A) Distribución normal del ratio PL45 B/PL45 A junto con los valores de SD y porcentajes de spots con variaciones.
- (B) Localización de los spots diferenciales, considerando la SD como umbral de valor de cambio. En azul se resaltan los spots que disminuyen y en rojo los que aumentan.

El listado de los spots con diferente abundancia y su ratio de variación se puede consultar en la Tabla 5 del **Apéndice**.

Tras el análisis por espectrometría de masas de las huellas peptídicas de las proteínas problema y la consulta en la base de datos MASCOT, se

identificaron 12 proteínas con volumen de abundancia aumentado respecto al control (Tabla 11).

TABLA 11. PROTEÍNAS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN CO-CULTIVOS PL45 + FIBROBLASTOS LC5, RESPECTO A PL45.

Spot	Proteína	Variación	Ratio
956	C-1-tetrahidrofolato sintetasa, citoplasmática	Aumento	+3.06
990	Factor de elongación 2	Aumento	+2.99
1036	Factor de elongación 2	Aumento	+3.57
1102	ATPasa del Retículo endoplasmático de transición	Aumento	+4.04
1291	Radixina	Aumento	+3.26
1388	Proteína regulada por glucosa de 78 kDa	Aumento	+3.52
1431	XRCC6 (X-ray repair cross-complementing protein 6)	Aumento	+3.89
1451	Proteína de estrés 70, mitocondrial	Aumento	+4.06
1488	Heat shock cognate 71 kDa protein	Aumento	+3.65
1528	HSP70 1A/1B (Heat shock 70 kDa protein 1A/1B)	Aumento	+3.58
1596	Fosfoproteína 1 inducida por estrés	Aumento	+3.12
1690	Complejo T, proteína 1, subunidad ϵ	Aumento	+3.26
1721	HSP60 (60 kDa heat shock protein), mitocondrial	Aumento	+4.40

7.4.2.3. PL45: co-cultivo con fibroblastos vs cultivo con secretoma de fibroblastos (PL45 B / PL45 C).

Se realiza la comparación de ambos proteomas. Tras la normalización de los valores de abundancia, su distribución se representa en la gráfica de la Figura 47. Se considera la desviación estándar (SD) como valor umbral para definir un cambio. En este caso, el valor es 3.75 veces.

RESULTADOS

- 15 spots disminuyen la abundancia en PL45 B respecto a PL45 C, representando un 1.1 % respecto al total de spots detectados.
- 47 spots aumentan en abundancia, representando un 3.6 %.

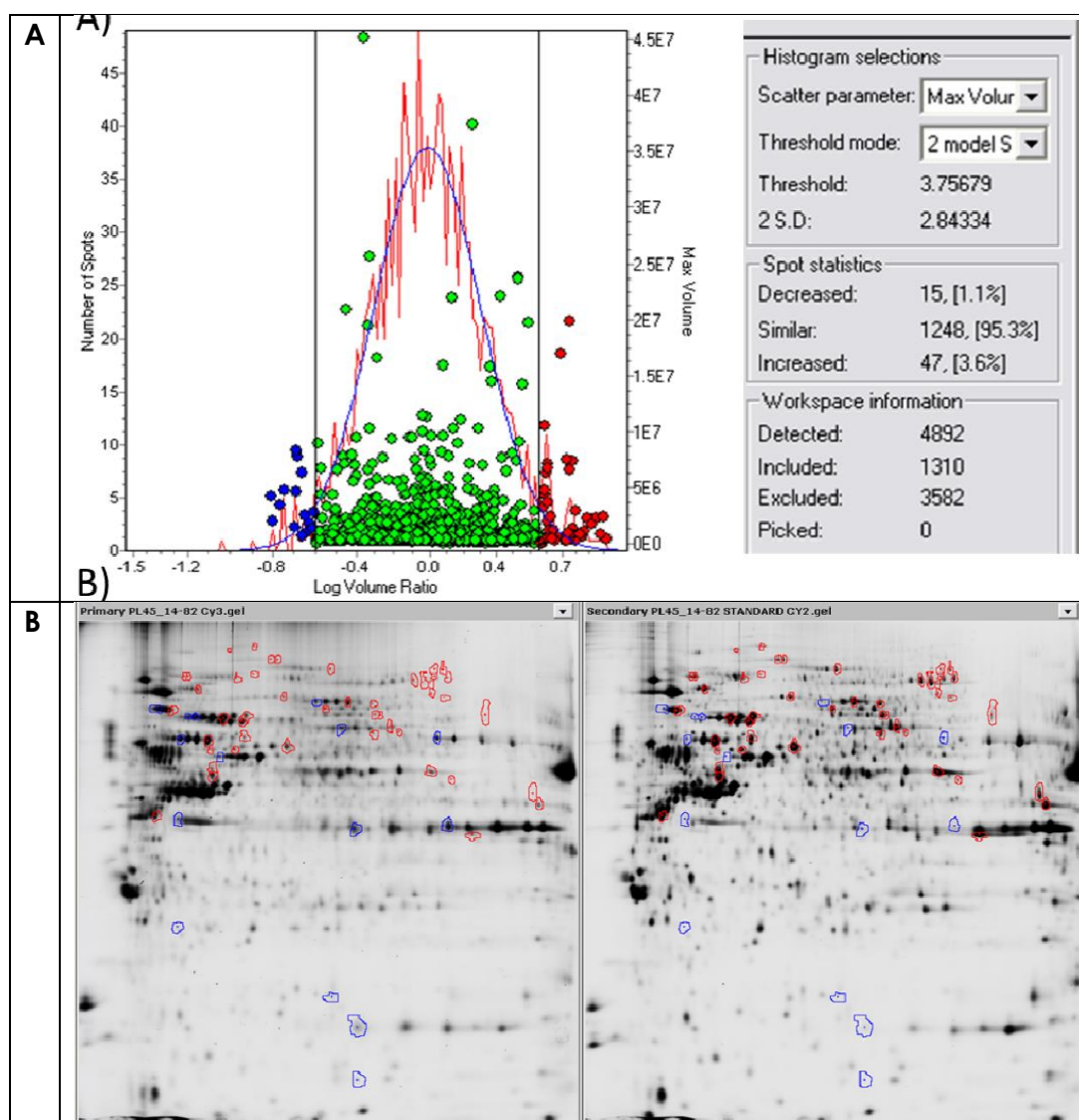


FIGURA 47. PL45: CO-CULTIVOS CON FIBROBLASTOS LC5 FRENTE A CULTIVOS CON SECRETOMAS DE LC5 (PL45 B / PL45 C)

- (A) Distribución normal del ratio PL45 B/PL45 C junto con los valores de SD y porcentajes de spots con variaciones.
- (B) Localización de los spots diferenciales, considerando la SD como umbral de valor de cambio. En azul se resaltan los spots que disminuyen y en rojo los que aumentan.

El listado de los *spots* con diferente abundancia y su *ratio* de variación se puede consultar en la Tabla 6 del **Apéndice**. Por necesidades de priorización, la identificación directa de los *spots* de esta comparación no se ha realizado. Pero algunos ya fueron identificados a partir de las dos comparaciones previamente descritas. La Tabla 12, describe la abundancia relativa de dichas proteínas en las células tumorales en co-cultivo frente a condiciones de cultivo con secretoma de fibroblastos.

TABLA 12. RELACIÓN DE SPOTS PROTEICOS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN LA COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE CO-CULTIVOS (PL45 + FIBROBLASTOS LC5) VERSUS CULTIVOS DE PL45 EN MEDIO CONDICIONADO LC5.

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
956	C-1-Tetrahidrofolato sintetasa, citoplasmática	Incrementada	+6.43
990	Factor de elongación 2	Incrementada	+4.16
1036	Factor de elongación 2	Incrementada	+7.43
1102	ATPasa del retículo endoplasmático de transición	Incrementada	+6.62
1291	Radixina	Incrementada	+5.51
1388	Proteína 78 kDa regulada por glucosa	Incrementada	+5.45
1431	XRCC6	Incrementada	+7.03
1451	Proteína de estrés 70, mitocondrial	Incrementada	+5.61
1456	Heat Shock Cognate 71 kDa protein	Disminuida	-6.32
1488	Heat Shock Cognate 71 kDa protein	Incrementada	+4.84
1528	HSP70 1A/1B	Incrementada	+5.22
1596	Fosfoproteína 1 inducida por estrés	Incrementada	+5.84
1690	Complejo T, proteína 1, Subunidad ϵ	Incrementada	+4.28
1721	HSP60	Incrementada	+5.38
1811	HSP60	Incrementada	+4.37
2545	Anexina A2	Incrementada	+4.01

7.4.3. Línea de Fibroblastos LC5 cultivados con Capan-1.

Tras el análisis del gel de este estudio se detectaron un total de 4932 spots. La Tabla 13 resume las variaciones observadas en la abundancia de las proteínas en cada comparación efectuada.

TABLA 13. RESUMEN DE LAS VARIACIONES EN EL GEL DE FIBROBLASTOS CULTIVADOS CON CÉLULAS O SECRETOMA DE LA LÍNEA CAPAN-1

Fibroblastos LC5	Nº SPOTS	Decrecen	Incrementan
Mono-cultivo LC5 vs Co-cultivo con Capan-1 (M1/M2)	4932	11 (0.4%)	9 (0.4%)
Mono-cultivo LC5 vs Co-cultivo con secretoma Capan-1 (M1/M4)		5 (0.2%)	8 (0.3%)
Co-cultivo con Capan-1 vs Co-cultivo con secretoma Capan-1 (M2/M4)		9 (0.4%)	8 (0.3%)

7.4.3.1.- Fibroblastos LC5 y Capan-1: Mono-cultivo LC5 vs Co-cultivo (M1/M2).

Se realizó la comparación de ambos proteomas. Tras la normalización de los valores de abundancia, su distribución se representa en la gráfica de la Figura 48. Se considera dos veces la desviación estándar (SD) como valor umbral para definir un cambio. En este caso, el valor es 1.62 veces.

- 11 spots disminuyen la abundancia en M1 respecto a M2 representando un 0.4% respecto al total de spots detectados.
- 9 spots aumentan en abundancia, representando un 0.4%.

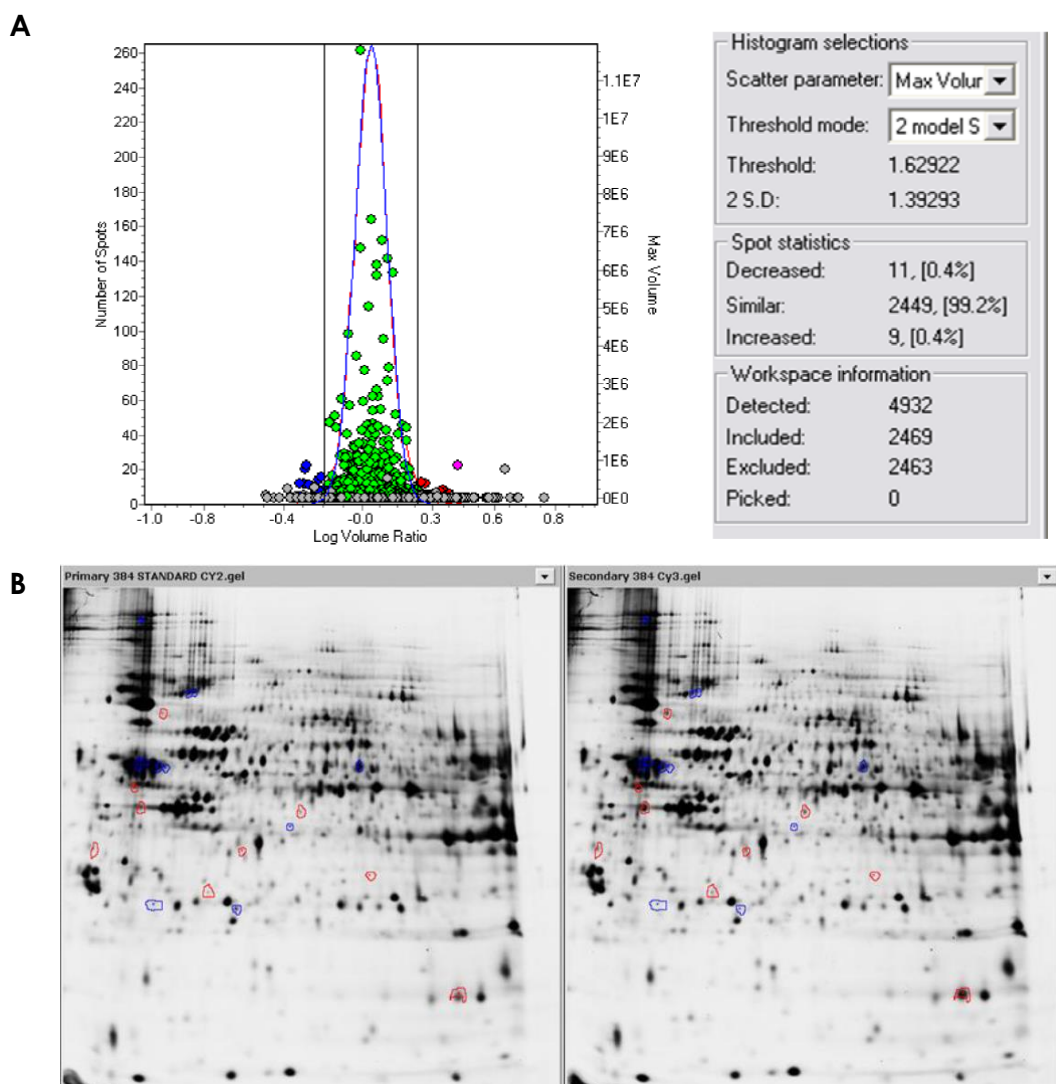


FIGURA 48. FIBROBLASTOS LC5: COMPARACIÓN DEL MONO-CULTIVO VS EL CO-CULTIVO CON CAPAN-1 (M1 / M2).

- (A) Distribución normal del ratio M1/M2 junto con los valores de SD y porcentajes de spots con variaciones.
- (B) Localización de los spots diferenciales, considerando 2xSD como umbral de valor de cambio. En azul se resaltan los spots que disminuyen y en rojo los que aumentan.

El listado de los spots con diferencias en abundancia y su ratio de variación se puede consultar en la Tabla 7 del **Apéndice**.

Tras el análisis por espectrometría de masas de las huellas peptídicas de las proteínas problema y la consulta en la base de datos MASCOT, se identificaron 8 proteínas relevantes con diferente abundancia (Tabla 14)

TABLA 14. PROTEÍNAS CON DIFERENTE ABUNDANCIA IDENTIFICADAS EN CO-CULTIVOS DE FIBROBLASTOS LC5 CON CAPAN-1 VS MONO-CULTIVO

Spot	Proteína	Variación
1694	α-actinina-4	Incremento
2424	Tubulina, cadena α-1C	Incremento
2436	Tubulina, cadena β	Incremento
2465	Tubulina, cadena α-1B	Incremento
2456	Vimentina	Incremento
1916	Proteín-glutamina gamma-glutamyl-transferasa 2	Disminución
2862	Inhibidor de la elastasa leucocitaria	Disminución
4406	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A	Disminución

7.4.3.2.- Fibroblastos LC5: Mono-cultivo vs cultivo con Secretoma de Capan-1 (M1 / M4).

Se realiza la comparación de ambos proteomas. Tras la normalización de los valores de abundancia, su distribución se representa en la gráfica de la Figura 49. Se considera dos veces la desviación estándar (SD) como valor umbral para definir un cambio. En este caso, el valor es 1.65 veces.

- 5 spots disminuyen la abundancia en M1 respecto a M4, representando un 0.2% respecto al total de spots detectados.
- 8 spots aumentan en abundancia representando un 0.3%.

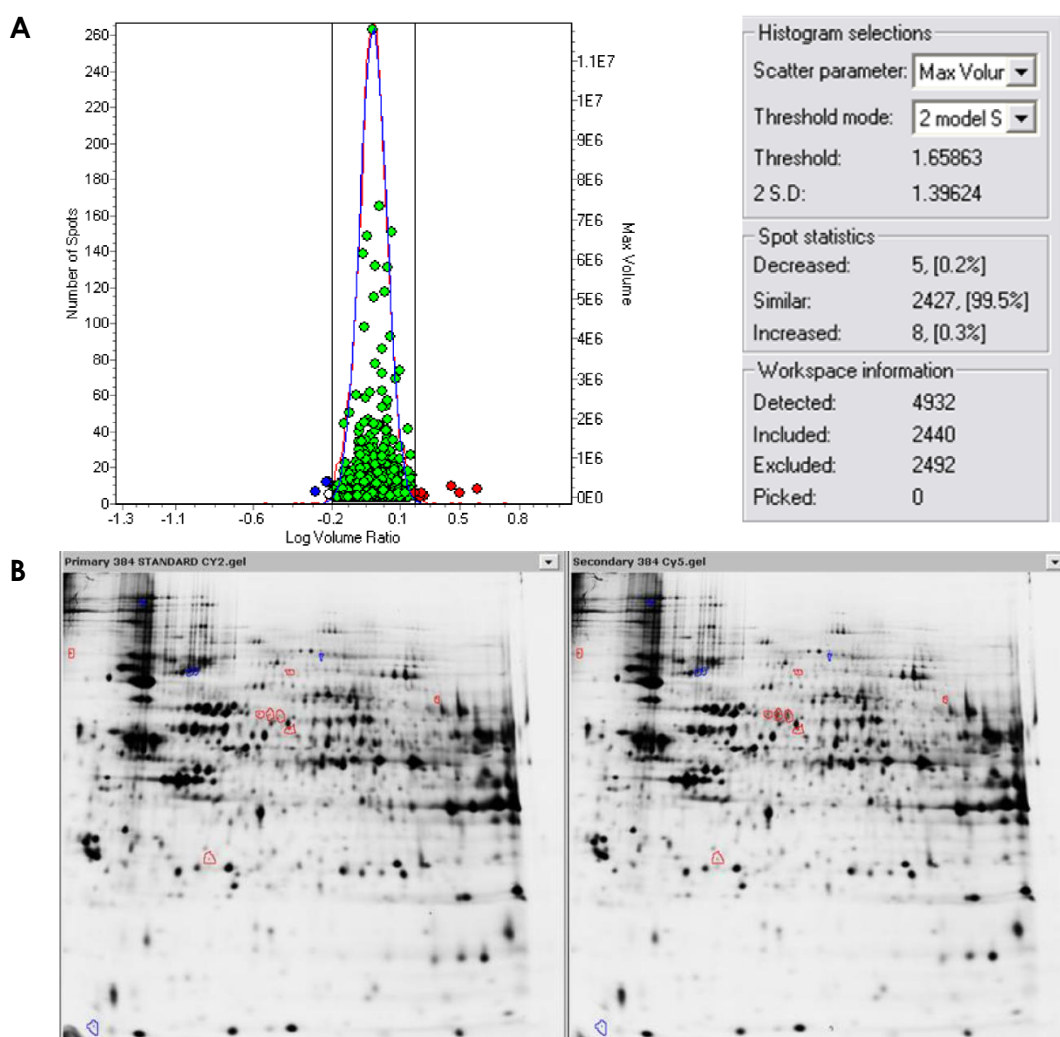


FIGURA 49. FIBROBLASTOS LC5: MONO-CULTIVO FRENTE A CULTIVO CON SECRETOMA DE CAPAN-1 (M1 / M4).

- (A) Distribución normal del ratio M1/M4 junto con los valores de SD y porcentajes de *spots* con variaciones.
- (B) Localización de los *spots* diferenciales, considerando 2xSD como umbral de valor de cambio. En azul se resaltan los *spots* que disminuyen y en rojo los que aumentan.

El listado de los *spots* con diferencias en abundancia y su *ratio* de variación se puede consultar en la Tabla 8 del **Apéndice**.

Tras el análisis por espectrometría de masas de las huellas peptídicas de las proteínas problema y la consulta en la base de datos MASCOT, se identificaron 2 proteínas relevantes con diferente abundancia.

TABLA 15. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN CULTIVOS DE FIBROBLASTOS LC5 CON SECRETOMA DE CAPAN-1 FRENTE A MONO-CULTIVOS DE LC5. (M4 / M1)

Spot	Proteína	Variación
1694	α-actinina-4	Incremento
2020	Piruvato kinasa PKM	Disminución

7.4.3.3.- Fibroblastos LC5: Co-cultivo con Capan-1 vs Cultivo con Secretoma de Capan-1(M2 / M4).

Se realiza la comparación de ambos proteomas. Tras la normalización de los valores de abundancia, su distribución se representa en la gráfica de la Figura 50. Se considera dos veces la desviación estándar (SD) como valor umbral para definir un cambio. En este caso, el valor es 1.62 veces.

- 9 spots disminuyen la abundancia en M2 respecto a M4, representando un 0.4% respecto al total de spots detectados.
- 8 spots aumentan en abundancia, representando un 0.3%.

El listado de los spots con diferencias de abundancia y su *ratio* de variación se puede consultar en la Tabla 9 del **Apéndice**.

Tras el análisis por espectrometría de masas de las huellas peptídicas de las proteínas problema y la consulta en la base de datos MASCOT, se identificaron 2 proteínas relevantes con diferencias en abundancia.

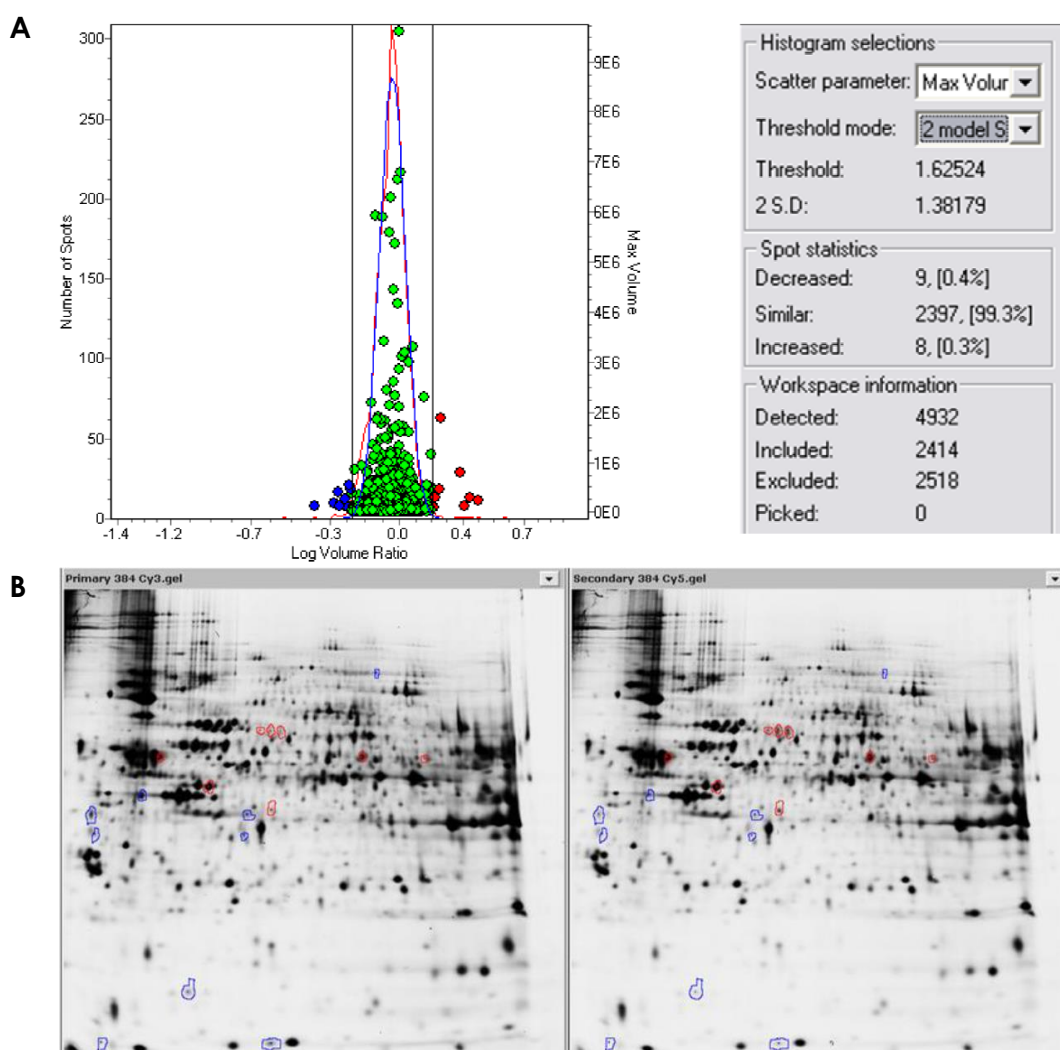


FIGURA 50. FIBROBLASTOS LC5: CO-CULTIVOS CON CAPAN-1 VS CULTIVO CON SECRETOMA DE CAPAN-1 (M2 / M4).

- (A) Distribución normal del ratio M2/M4 junto con los valores de SD y porcentajes de spots con variaciones.
- (B) Localización de los spots diferenciales, considerando 2xSD como umbral de valor de cambio. En azul se resaltan los spots que disminuyen y en rojo los que aumentan.

TABLA 16. PROTEÍNAS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN CO-CULTIVOS FIBROBLASTO + CAPAN-1 FRENTE A MONOCULTIVOS CON FIBROBLASTOS. (M2 / M4).

Spot No.	Proteína	Abundancia
2465	Vimentina	Incremento
2990	PCNA - Proliferating cell nuclear antigen	Disminución

7.4.4.- Línea de Fibroblastos LC5 cultivados con PL45.

Tras el análisis del gel DIGE se detectaron un total de 4667 spots. La Tabla 17 resume las variaciones observadas en la abundancia de proteínas en cada una de las comparaciones efectuadas.

TABLA 17. RESUMEN DE LAS VARIACIONES EN EL GEL DE FIBROBLASTOS CULTIVADOS CON CÉLULAS O SECRETOMA DE LA LÍNEA PL45

Fibroblastos LC5	Nº SPOTS	Decrecen	Incrementan
Mono-cultivo LC5 vs Co-cultivo con PL45 (M1/M3)	4667	10 (0.6%)	8 (0.5%)
Mono-cultivo LC5 vs Co-cultivo con secretoma PL45 (M1/M5)		4 (0.2%)	12 (0.7%)
Co-cultivo con Capan-1 vs Co-cultivo con secretoma PL45 (M3/M5)		11 (0.7%)	1 (0.1%)

7.4.4.1. Fibroblastos LC5: Mono-Cultivo vs Co-Cultivo con PL45 (M1 / M3).

Se realiza la comparación de ambos proteomas. Tras la normalización de los valores de abundancia, su distribución se representa en la gráfica de la Figura 51. Se considera dos veces la desviación estándar (SD) como valor umbral para definir un cambio. En este caso, el valor es 1.49 veces.

- 10 spots disminuyen la abundancia en M1 respecto a M3, representando un 0.6% respecto al total de spots detectados.
- 8 spots aumentan en abundancia, representando un 0.5%.

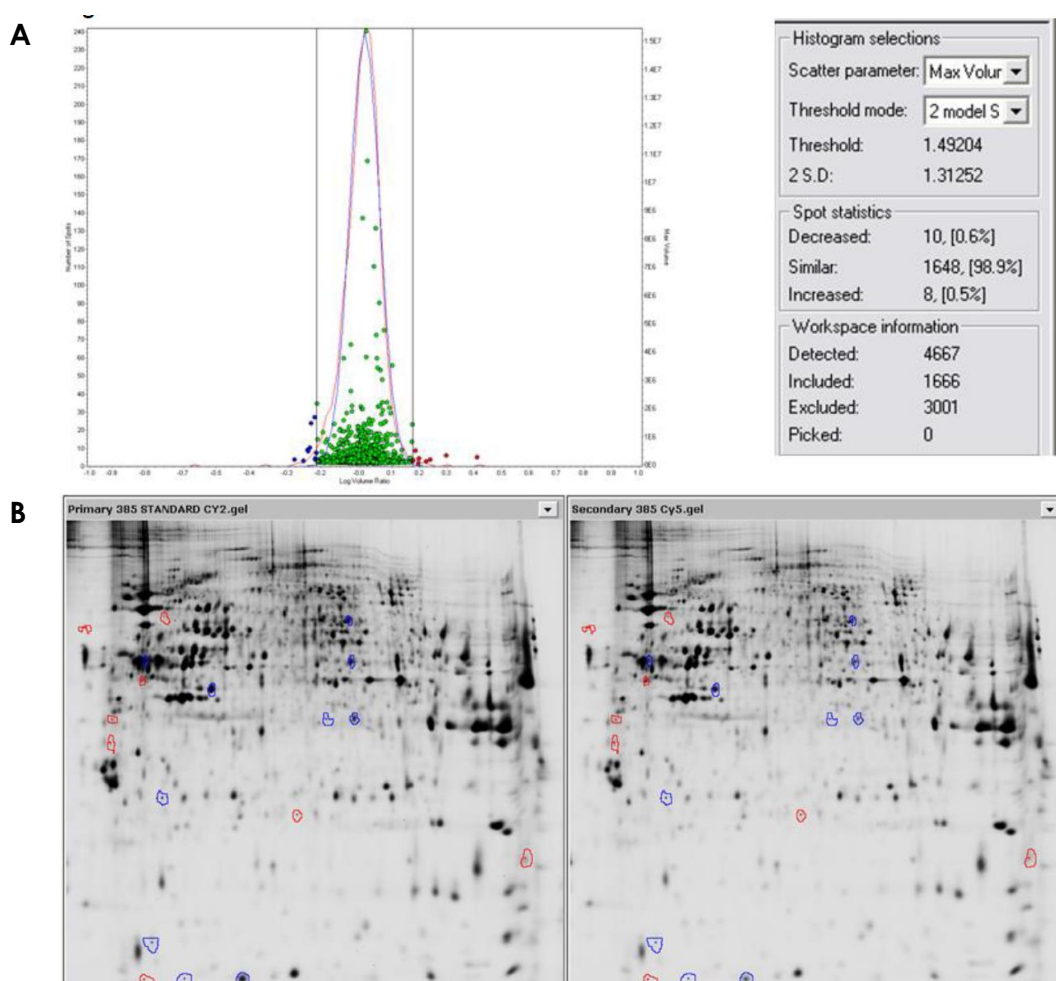


FIGURA 51. COMPARACIÓN ENTRE PROTEOMAS DE FIBROBLASTOS LC5 EN MONO-CULTIVO VS CO-CULTIVO CON PL45 (M1 / M3)

- (A) Distribución normal del ratio M1/M3 junto con los valores de SD y porcentajes de spots con variaciones.
- (B) Localización de los spots diferenciales, considerando 2xSD como umbral de valor de cambio. En azul se resaltan los spots que disminuyen y en rojo los que aumentan.

El listado de los spots con diferencias en su abundancia, así como su ratio de variación se puede consultar en la Tabla 10 del **Apéndice**.

Tras el análisis por espectrometría de masas de las huellas peptídicas de las proteínas problema y la consulta en la base de datos MASCOT, se identificaron 6 proteínas con diferente abundancia.

TABLA 18. PROTEÍNAS CON DIFERENCIAS EN SU ABUNDANCIA EN CO-CULTIVOS DE FIBROBLASTOS CON PL45 FRENTE A MONO-CULTIVOS DE FIBROBLASTOS. (M3 / M1)

Spot	Proteína	Variación
1643	Adenosil-homocisteinasa	Incremento
2115	Tubulina, cadena β	Incremento
2141	Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	Incremento
2638	Anexina A1	Incremento
3319	Peróxido-reductasa mitocondrial, dependiente de tioredoxinal	Disminución
3737	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa B	Disminución

7.4.4.2. Fibroblastos LC5: Mono-cultivo vs Cultivo con Secretoma de PL45 (M1 / M5).

Se realiza la comparación de ambos proteomas. Tras la normalización de los valores de abundancia, su distribución se representa en la gráfica de la Figura 52. Se considera dos veces la desviación estándar (SD) como valor umbral para definir un cambio. En este caso, el valor es 1.74 veces.

- 4 spots disminuyen la abundancia en M1 respecto a M5, representando un 0.2% respecto al total de spots detectados.
- 12 spots aumentan en abundancia, representando un 0.7%.

El listado de los spots con diferente abundancia y su *ratio* de variación se puede consultar en la Tabla 11 del **Apéndice**.

Tras el análisis por espectrometría de masas de las huellas peptídicas de las proteínas problema y la consulta en la base de datos MASCOT, se identificó una proteína con abundancia diferente.

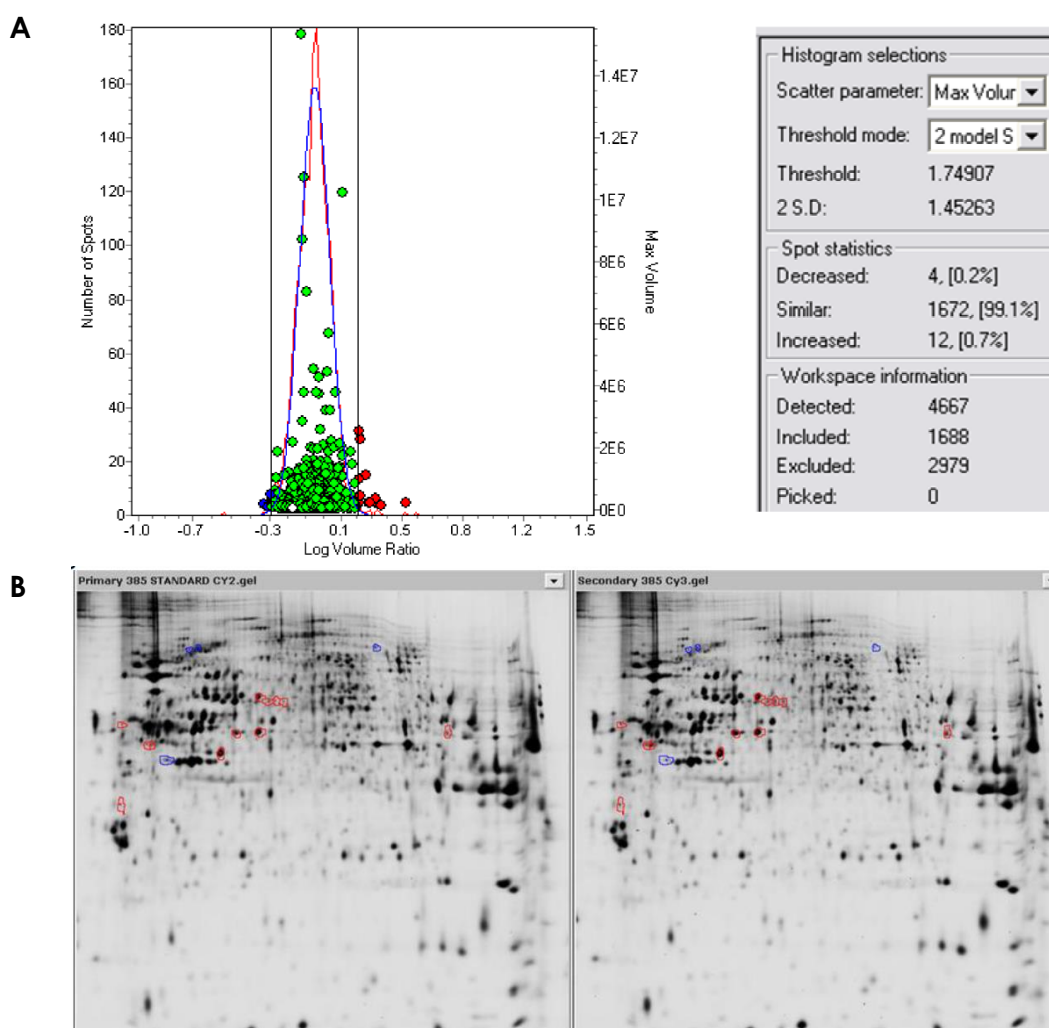


FIGURA 52. COMPARACIÓN ENTRE PROTEOMAS DE FIBROBLASTOS LC5 VS FIBROBLASTOS CRECIDOS CON SECRETOMA DE PL45 (M1 / M5).

- (A) Distribución normal del ratio M1/M5 junto con los valores de SD y porcentajes de spots con variaciones.
- (B) Localización de los spots diferenciales, considerando 2xSD como umbral de valor de cambio. En azul se resaltan los spots que disminuyen y en rojo los que aumentan.

TABLA 19. PROTEÍNA IDENTIFICADA CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN CULTIVOS DE FIBROBLASTOS CON SECRETOMA DE PL45 FRENTE A MONO-CULTIVOS DE FIBROBLASTOS (M5 / M1).

Spot	Proteína	Variación
2214	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Disminución

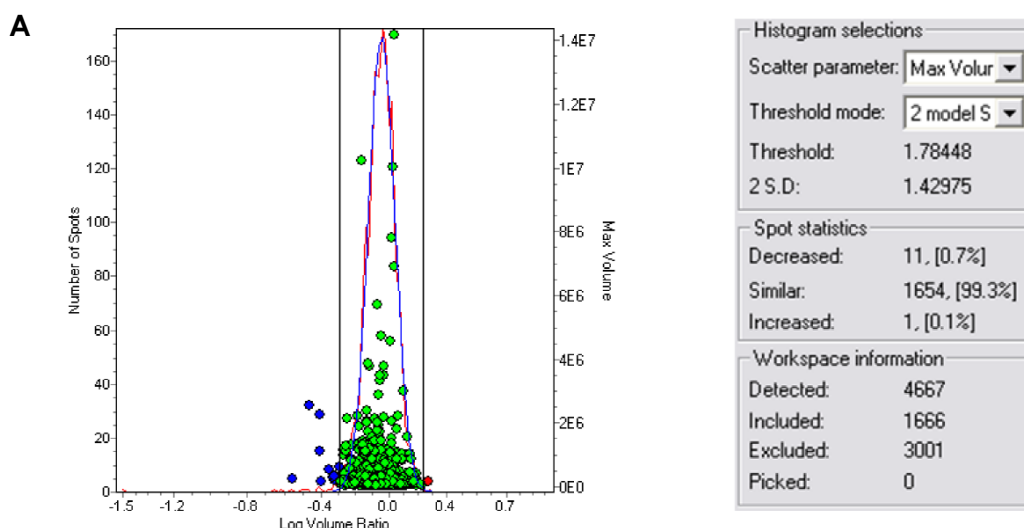
7.4.4.3. Fibroblastos LC5: Co-Cultivos con PL45 vs Cultivo con Secretoma de PL45 (M5 / M3).

Se realiza la comparación de ambos proteomas. Tras la normalización de los valores de abundancia, su distribución se representa en la gráfica de la Figura 53. Se considera dos veces la desviación estándar (SD) como valor umbral para definir un cambio. En este caso, el valor es 1.78 veces (Figura 53).

- 11 spots disminuyen la abundancia en M5 respecto a M3 representando un 0.7% respecto al total de spots detectados.
- 1 spots aumentan en abundancia representando un 0.1%.

El listado de los spots con abundancia diferente y su *ratio* de variación se puede consultar en la Tabla 12 del **Apéndice**.

Tras el análisis por espectrometría de masas de las huellas peptídicas de las proteínas problema y la consulta en la base de datos MASCOT, se identificaron 3 proteínas con volumen de abundancia diferenciado (Tabla 20).



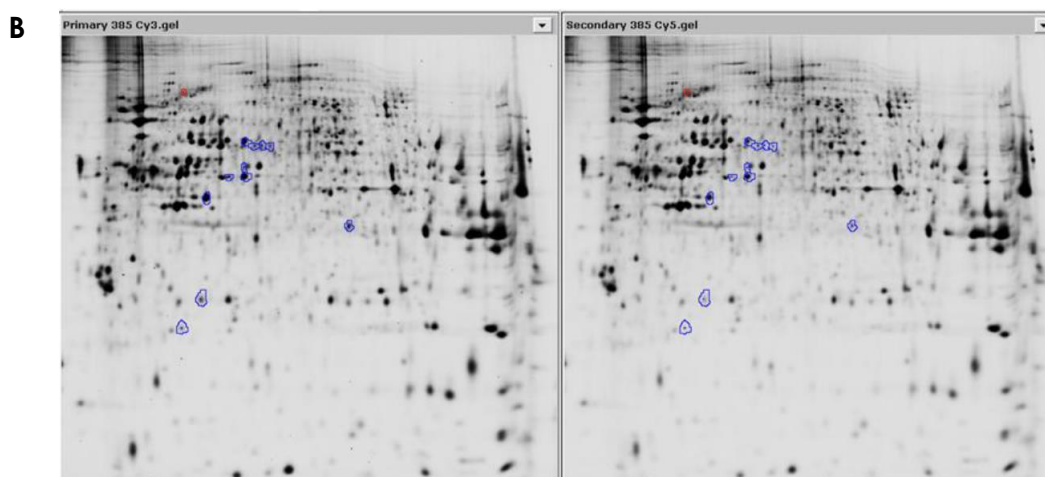


FIGURA 53. COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE FIBROBLASTOS LC5 CRECIDOS CON SECRETOMA DE PL45 VS CO-CULTIVADOS CON PL45 (M5 / M3).

- (A) Distribución normal del ratio M5/M3 junto con los valores de SD y porcentajes de *spots* con variaciones.
- (B) Localización de los *spots* diferenciales, considerando 2xSD como umbral de valor de cambio. En azul se resaltan los *spots* que disminuyen y en rojo los que aumentan.

TABLA 20. PROTEÍNAS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN FIBROBLASTOS LC5 CRECIDOS CON SECRETOMA DE PL45 VS CO-CULTIVADOS CON PL45 (M5 / M3).

Spot No.	Proteína	Abundancia
2091	Proteín disulfuro-isomerasa A3	Disminuida
3404	Peroxirredoxina-2	Disminuida

7.4.5. Interpretación funcional de los resultados de la proteómica por DIGE.

7.4.5.1. Líneas de células tumorales Capan-1 y PL45.

Los estudios de proteómica han identificado y cuantificado un total de 19 proteínas diferencialmente expresadas entre las dos líneas celulares y las

RESULTADOS

dos condiciones relevantes (Co-cultivos vs mono-cultivos; cultivos con secretoma vs mono-cultivos con medio normal). La distribución clasificada de las proteínas identificadas se representa en la Figura 54.

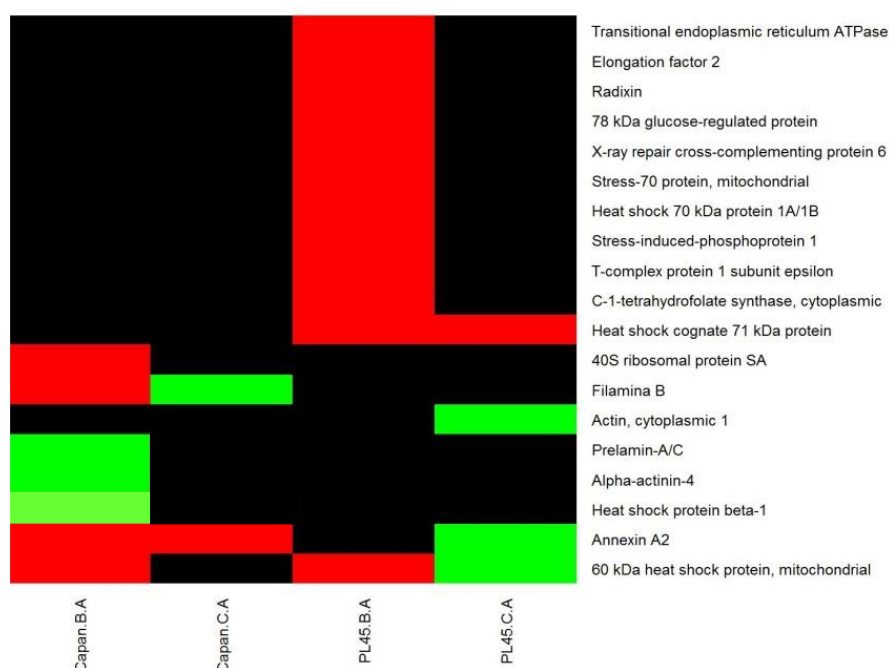


FIGURA 54. DISTRIBUCIÓN DE LAS VARIACIONES DE LA ABUNDANCIA DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS, JERARQUIZADAS POR LÍNEA CELULAR Y CONDICIÓN.

Rojo: incremento de Abundancia; Verde= Disminución de Abundancia. Negro: Ausencia de identificación en línea/condición.

Capan B / A – co-cultivo con fibroblastos vs mono-cultivo; Capan C / A – cultivo con secretoma de fibroblastos vs monocultivo; PL45 B / A – co-cultivo con fibroblastos vs mono-cultivo; PL 45 C / A – cultivo con secretoma de fibroblastos vs mono-cultivo.

El análisis de las vías moleculares (ver 6.4.5.4. Análisis de las vías moleculares KEGG (87)) detectó un enriquecimiento estadísticamente significativo de las proteínas detectadas en varias vías, de las que destacamos, por su relevancia, las siguientes:

- Enfermedad de priones (p=0.0001)
- Procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico (p-valor = 0.0002),

- Miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho ($p=0.0004$)
- Procesamiento y presentación de antígenos ($p = 0.0004$),
- Adhesión focal ($p = 0.0043$),
- Regulación del citoesqueleto de actina ($p = 0.0046$),
- Degradación de RNA ($p = 0.0075$),
- Unión adherente ($p = 0.0075$),
- Miocardiopatía hipertrófica ($p=0.0086$)

Se especificó un umbral de significación de p en 0.01, tras realizar los cálculos y correcciones expuestos en Material y Métodos. Se realizó un estudio específico por línea y condición de cultivo. Para ello se requirió la presencia de al menos 2 proteínas en cada categoría y análisis.

7.4.5.2. Línea tumoral Capan-1.

Cuando se comparan los co-cultivos con fibroblastos con los monocultivos de células tumorales, el presente estudio no detecta un enriquecimiento significativo en ninguna de las vías moleculares KEGG.

Las proteínas que aparecen significativamente disminuidas en los co-cultivos con fibroblastos respecto a los mono-cultivos de células tumorales son la α -actinina 4, la HSP- β -1 y prelamina A/C. Estas proteínas aparecen enriquecidas en la vía denominada de la "miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho", representada en la Figura 55, y participan en la regulación del citoesqueleto de actina.

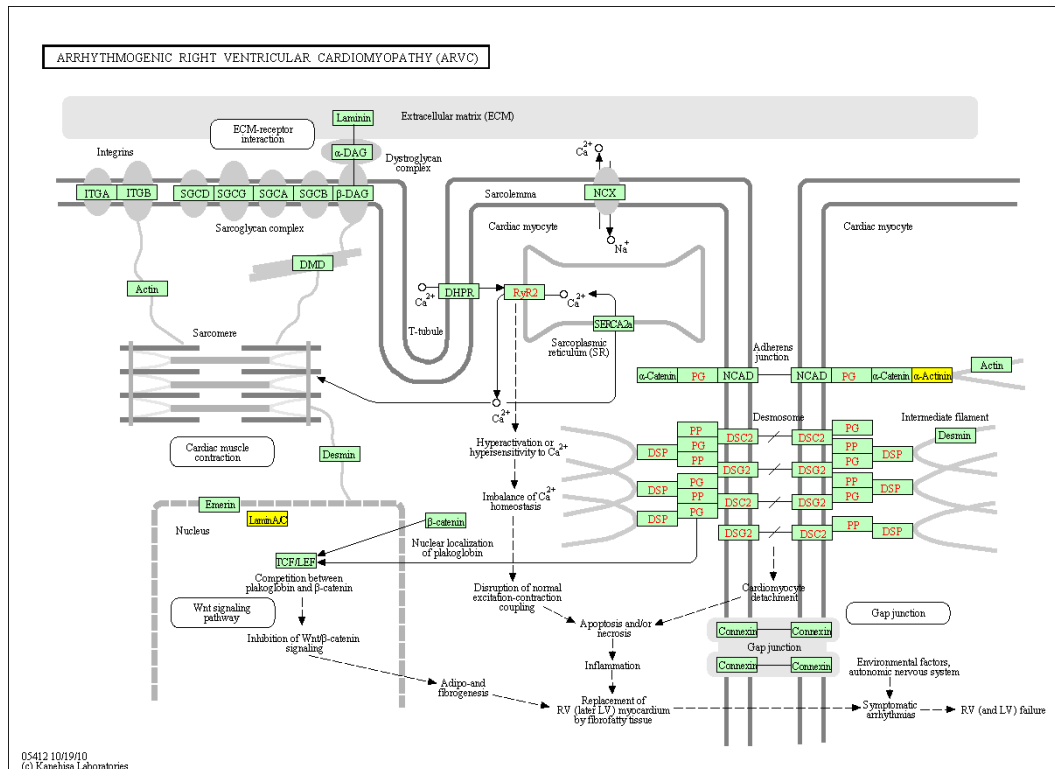


FIGURA 55. KEGG: VÍA MIOCARDIOPATÍA ARRITMOGÉNICA DEL VENTRÍCULO DERECHO.

Lamin A/C, lamina; α-Actinin: α-actinina-4

Con respecto a las vías en las que están involucradas las proteínas que disminuyen en los co-cultivos, destacan las de las uniones adherentes, uniones estrechas, migración transendotelial, adhesión focal y regulación del citoesqueleto de actina. No se puede demostrar un cambio significativo para ninguna de ellas.

Cuando se comparan los cultivos de Capan-1 en secretoma de fibroblastos, frente a los cultivos en medio normal, no pueden identificarse vías con cambios estadísticamente significativos.

Los análisis de enriquecimiento realizados con las herramientas GO /GO Slim (Gene Ontology, ver Material y Métodos), no mostraron variaciones significativas entre las distintas condiciones de cultivo de esta línea celular.

7.4.5.3. Línea tumoral PL45.

Las 12 proteínas incrementadas en los co-cultivos con fibroblastos, frente a los mono-cultivos son HSP60 mitocondrial, factor de elongación 2, ATPasa del retículo endoplasmático de transición, radixina, proteína regulada por glucosa de 78 kDa, XRCC-6, HSP70 1A/1B(mitocondrial), fosfoproteína 1 inducida por estrés, Proteína 1, subunidad ϵ , del complejo T, C-1 tetrahidrofolato reductasa. Estas proteínas se encuentran involucradas en vías relevantes para el desarrollo neoplásico, algunas de las cuales muestran un enriquecimiento significativo (p ajustada menor de 0.01) en dichas proteínas:

- Enfermedad de priones
- Procesamiento y presentación de antígenos
- Procesamiento de proteínas en retículo endoplasmático
- "Spliceosoma"
- Degradación de RNA.
- Toxoplasmosis

De ellas, representaremos sólo las 3 primeras vías KEGG, por considerarlas más relevantes para la discusión

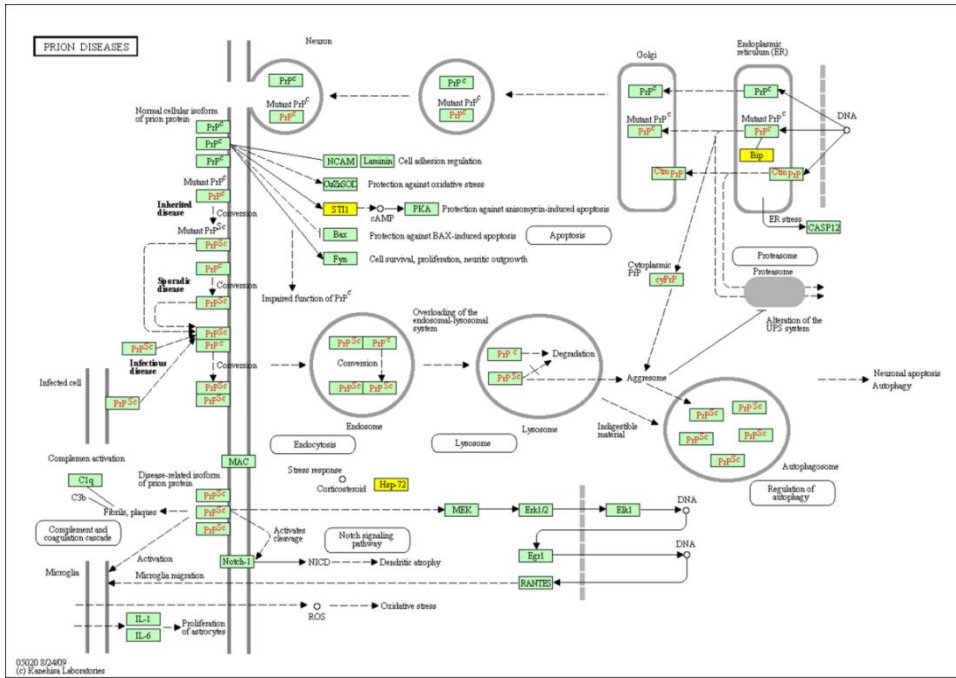


FIGURA 56. KEGG: VÍAS DE LAS ENFERMEDADES POR PRIONES

STI1 Stress-induced-phosphoprotein 1; HSP72 (Heat shock 70 kDa protein 1A/1B); BiP 78 kDa glucose-regulated protein

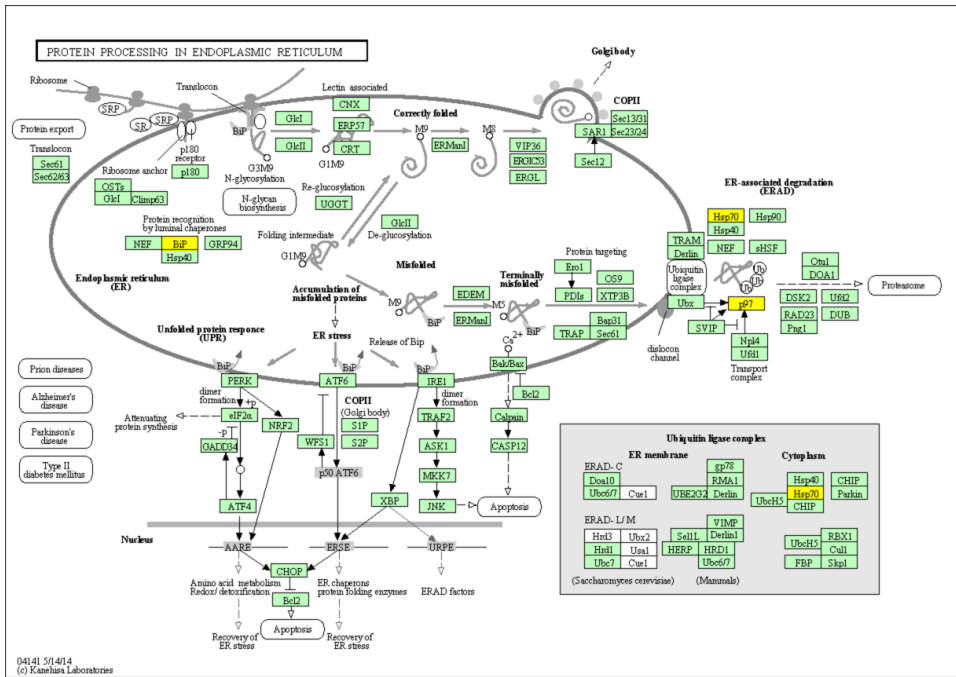


FIGURA 57. KEGG: PROCESAMIENTO DE PROTEÍNAS EN RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.

BiP 78 kDa glucose-regulated protein HSP70 Heat shock 70 kDa protein 1A/1B
p97 Transitional endoplasmic reticulum ATPase

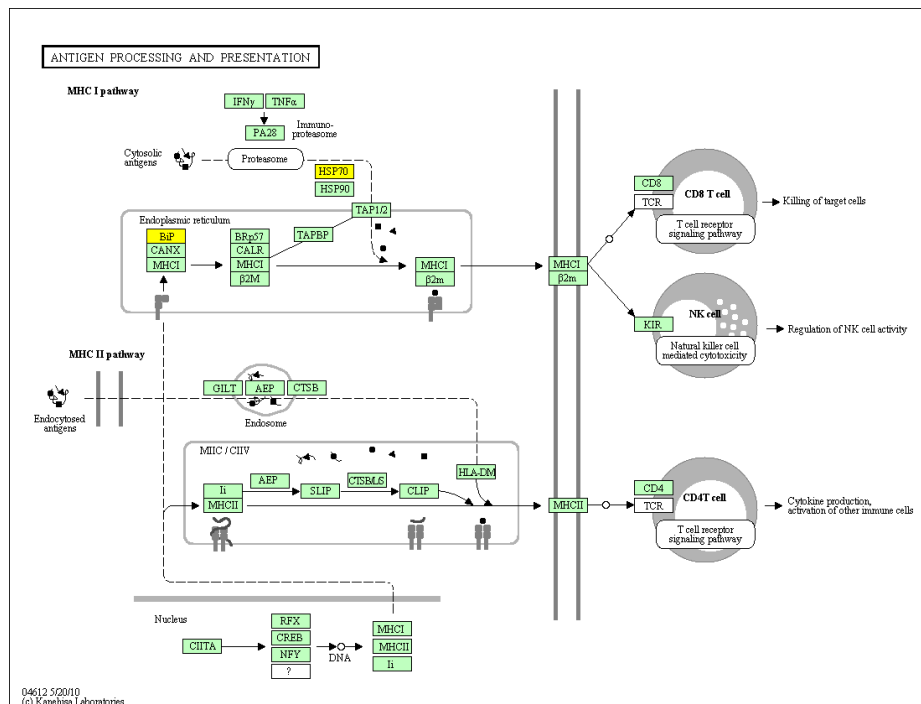


FIGURA 58. KEGG: PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS.

BiP 78 kDa glucose-regulated protein
HSP70 Heat shock 70 kDa protein 1A/1B

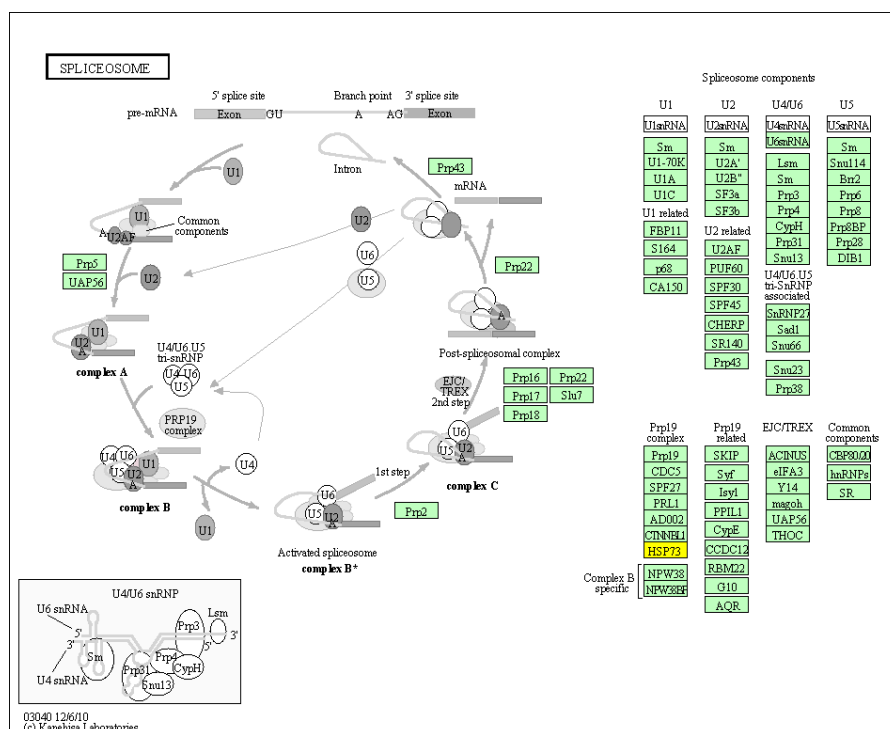


FIGURA 59. KEGG: "SPliceosoma"

HSP73 Heat shock 70 kDa protein 1A/1B

RESULTADOS

No se pudieron identificar vías significativamente modificadas en los cultivos de PL45 crecidos con secretoma de fibroblastos, frente a los mono-cultivos de PL45.

Los análisis de enriquecimiento realizados con las herramientas GO /GO Slim (Gene Ontology, ver Material y Métodos), tampoco mostraron variaciones significativas entre las distintas condiciones de cultivo de esta línea celular.

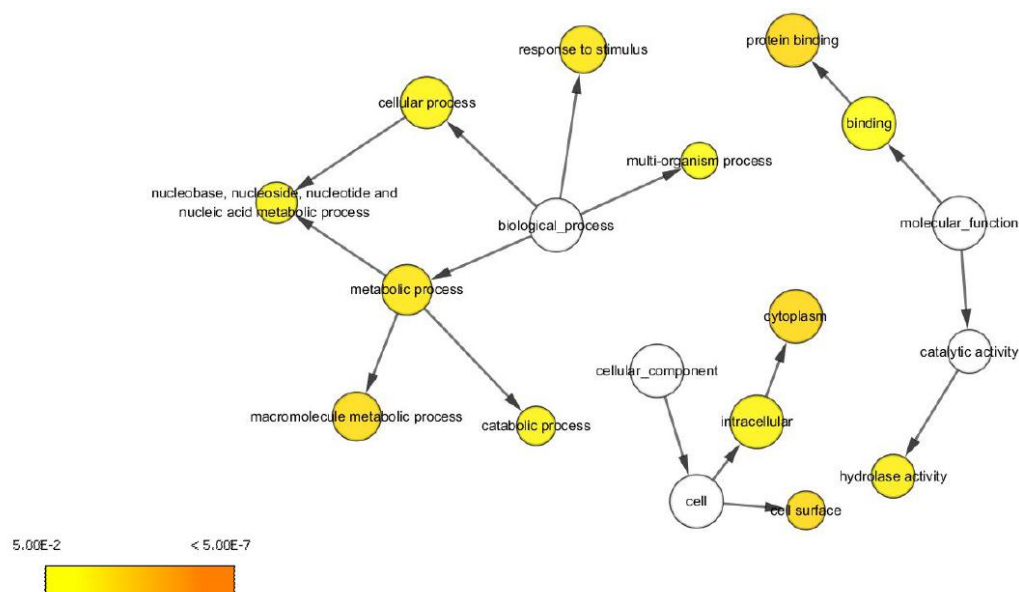


FIGURA 60. ANÁLISIS GO DE LAS PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN PL45

7.4.5.4. Línea de fibroblastos LC5.

Hay varias vías relevantes para la progresión neoplásica en las que están implicadas las proteínas cuya abundancia cambia con los co-cultivos con células tumorales. Entre ellas destacan:

Comunicación intercelular:

- Unión adherente
- Adhesión focal

- Uniones estrechas
- Unión Gap

Motilidad celular:

- Migración transendotelial
- Regulación del citoesqueleto de actina
- Fagocitosis

Regulación de MicroRNAs en cáncer.

Vías metabólicas:

- Señalización de glucagón
- Glicólisis/Gluconeogénesis,
- Metabolismo de piruvato
- Diabetes mellitus
- Ruta de las pentosas fosfato
- Metabolismo de glutatión.
- Fosforilación oxidativa
- Metabolismo de purinas
- Metabolismo de carbono
- Biosíntesis de aminoácidos
- Metabolismo de cisteína y metionina

Estas variaciones son especialmente frecuentes en los co-cultivos con Capan-1. De todas ellas, la única que muestran un enriquecimiento significativo es la de las uniones gap (Figura 61).

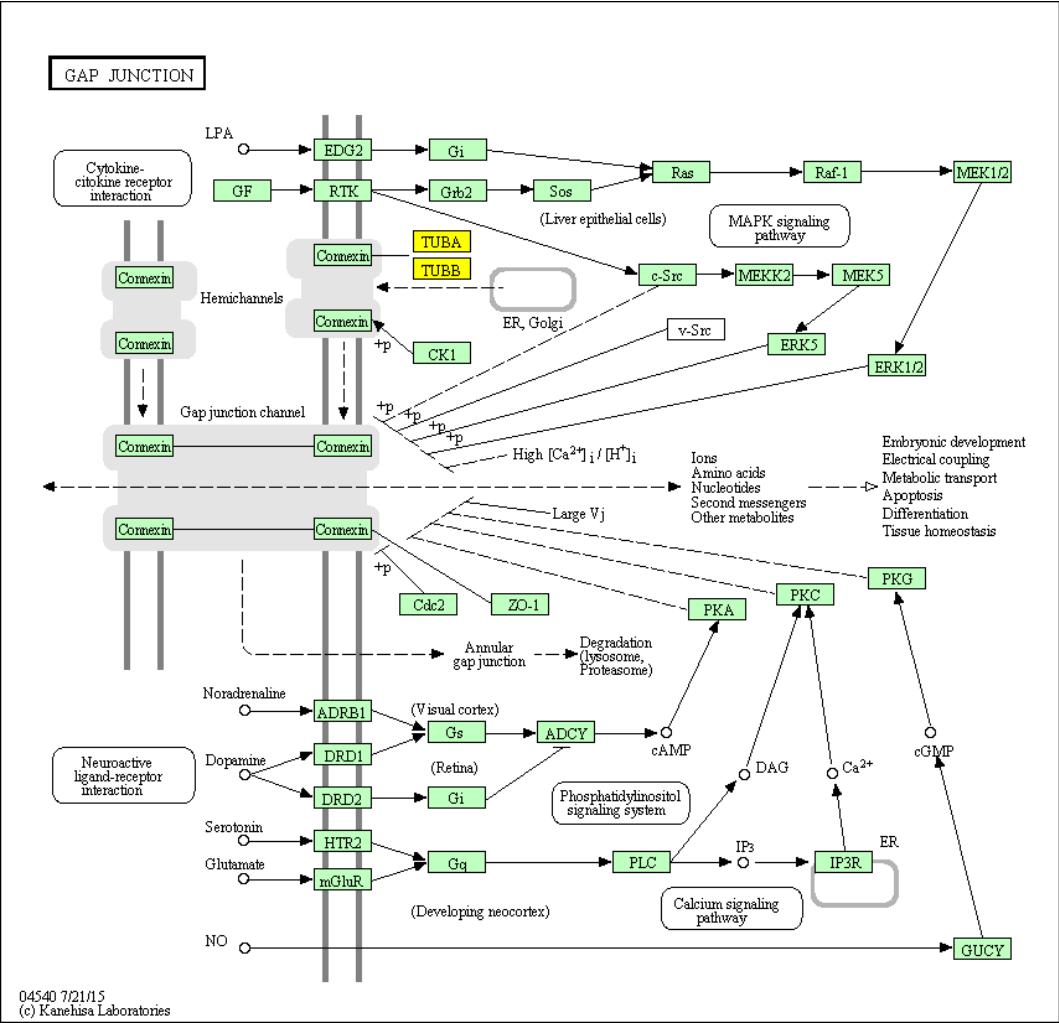


FIGURA 61. KEGG: UNIONES GAP.

7.5. MODIFICACIONES DEL METABOLISMO ENERGÉTICO DURANTE LA INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS TUMORALES Y FIBROBLASTOS.

A la hora de estudiar posibles cambios en metabolismo energético tanto en las células tumorales como en los fibroblastos, se advirtió que el propio procesamiento de las células al pasar por el FACS-Sorter podría teóricamente interferir en los resultados. Para controlar esta posibilidad, se optó por un diseño experimental diferente, realizando los cultivos en cámaras Transwell®.

La siguiente figura (Figura 62) es una fotografía representativa de los RPPMA realizados en este estudio según la metodología desarrollada en el apartado 6.5. METABOLISMO CELULAR BIOENERGÉTICO EN LÍNEAS TUMORALES PANCREÁTICAS Y FIBROBLASTOS.

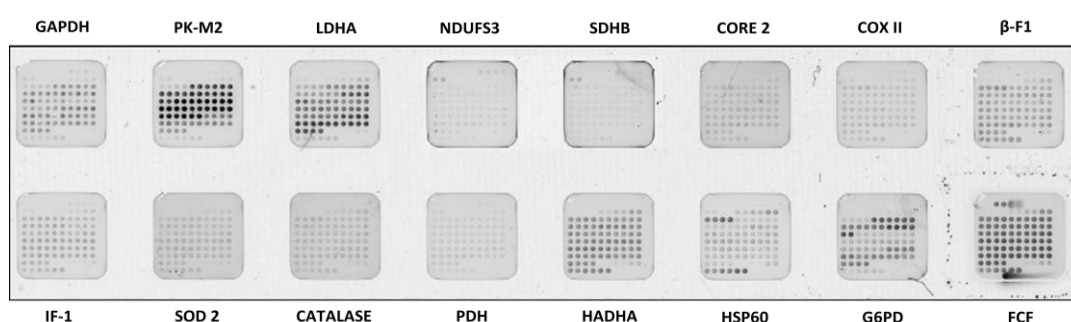


FIGURA 62. MATRICES DE ARRAY DE PROTEÍNAS EN FASE REVERSA REALIZADOS.

Todas las condiciones celulares estudiadas muestran un aumento de respuesta lineal a la intensidad de fluorescencia en función de la cantidad de proteína aplicada, como puede comprobarse en las curvas estándar (Figura 20) y que es utilizada para la cuantificación de la expresión de las distintas proteínas. En consonancia con la alta afinidad y

RESULTADOS

especificidad de los anticuerpos monoclonales utilizados, cada matriz ilustra el reconocimiento específico del antígeno incluso en cantidades muy pequeñas del mismo. No se observó ninguna señal fluorescente en los puntos correspondientes a BSA y utilizados como controles negativos, indicando la insignificante señal de fondo de esta técnica.

7.5.1. Modelo Capan-1.

Las líneas celulares han sido crecidas de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos, en placas Transwell®, sembrando en el compartimento superior la línea tumoral y en el inferior, los fibroblastos. En los controles, se sembró la línea celular en el compartimento superior, mientras que el compartimento inferior fue rellenado con medio de cultivo.

A continuación se exponen los resultados obtenidos de la cuantificación de cada uno de los marcadores descritos anteriormente, en este modelo de co-cultivo de la línea tumoral pancreática Capan-1.

Para facilitar el diseño de los gráficos (Figura 63) y la interpretación de los resultados (Tabla 21), las condiciones estudiadas son codificadas del siguiente modo:

- Condición A: Línea tumoral Capan-1 crecida aisladamente.
- Condición B: Línea tumoral Capan-1 que ha interactuado con fibroblastos LC5.
- Condición E: Fibroblastos LC5 crecidos aisladamente.
- Condición F: Fibroblastos LC5 que han interactuado con Capan-1.

Tras el análisis estadístico de los resultados (Tabla 21), podemos comprobar que existen diferencias significativas en la expresión génica de un gran número de proteínas pertenecientes a esta "firma energética", en la línea tumoral Capan-1 cuando está sometida a la influencia de los fibroblastos, en comparación con la expresión de estas proteínas cuando Capan-1 se crece sin la presencia de los mismos.

RESULTADOS

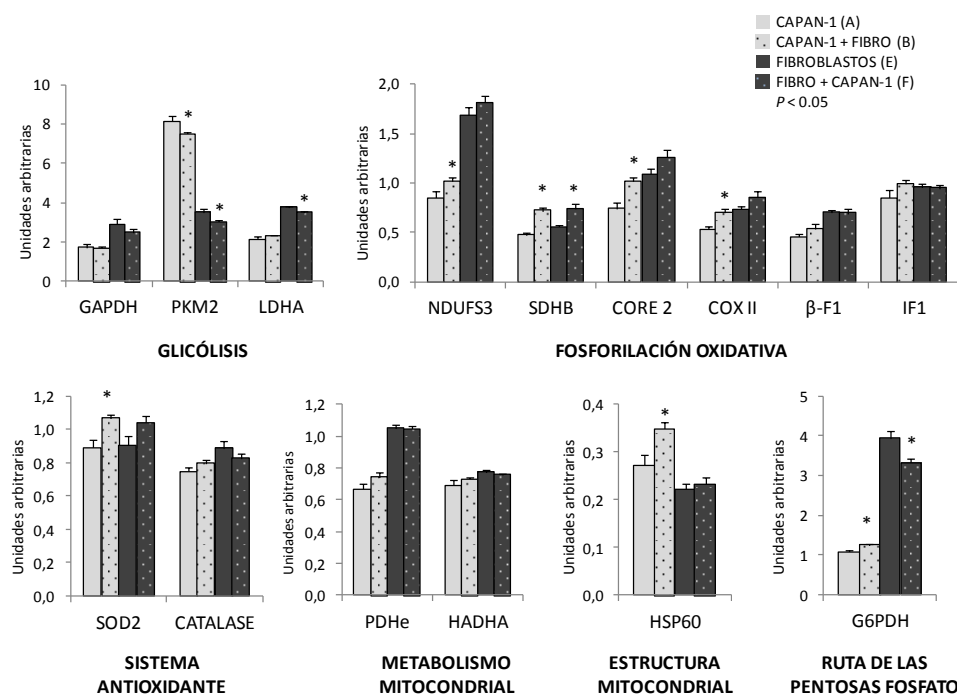


FIGURA 63. PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EN CO-CULTIVOS: CAPAN-1

En concreto, en condiciones de co-cultivo, ven aumentada su expresión las proteínas pertenecientes a la fosforilación oxidativa, NDUFS3, SDHB, CORE2 y COXII; la proteína SOD2, perteneciente al sistema antioxidante; la proteína estructural de mitocondria HSP60; y la proteína G6PDH, perteneciente a la ruta de las pentosas fosfato. Por el contrario, la única proteína de Capan-1 que ve disminuida su expresión en condiciones de co-cultivo con fibroblastos LC5 es la proteína glicolítica PKM2.

Los fibroblastos LC5 también modifican la expresión de determinadas proteínas del metabolismo energético celular, cuando crecen en co-cultivo con la línea tumoral pancreática Capan-1: aumenta la expresión de la proteína de la fosforilación oxidativa SDHB, y disminuye la proteína PKM2 de la ruta de la glicólisis. Estas proteínas manifiestan el mismo sentido de variación en las células tumorales pancreáticas.

Los resultados estadísticos se exponen en la Tabla 21:

UNIDADES ARBITRARIAS										
CAPAN-1	MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA (SEM)								T-STUDENT	
	A		B		E		F			
	MEAN	SEM	MEAN	SEM	MEAN	SEM	MEAN	SEM	A vs B	E vs F
GAPDH	1,71	$\pm 0,16$	1,70	$\pm 0,09$	2,92	$\pm 0,25$	2,49	$\pm 0,16$	0,930	0,179
PKM2	8,14	$\pm 0,26$	7,50	$\pm 0,11$	3,52	$\pm 0,14$	3,04	$\pm 0,06$	0,045	0,009
LDHA	2,14	$\pm 0,12$	2,34	$\pm 0,02$	3,76	$\pm 0,05$	3,51	$\pm 0,05$	0,148	0,007
NDUFS3	0,85	$\pm 0,06$	1,02	$\pm 0,04$	1,68	$\pm 0,08$	1,82	$\pm 0,07$	0,049	0,254
SDHB	0,48	$\pm 0,01$	0,72	$\pm 0,04$	0,56	$\pm 0,02$	0,73	$\pm 0,05$	0,000	0,011
CORE 2	0,74	$\pm 0,06$	1,02	$\pm 0,04$	1,09	$\pm 0,05$	1,26	$\pm 0,07$	0,003	0,075
COXII	0,53	$\pm 0,03$	0,69	$\pm 0,05$	0,73	$\pm 0,03$	0,86	$\pm 0,06$	0,016	0,087
β -F1	0,46	$\pm 0,03$	0,54	$\pm 0,05$	0,70	$\pm 0,02$	0,69	$\pm 0,04$	0,140	0,822
IF1	0,85	$\pm 0,08$	1,00	$\pm 0,04$	0,96	$\pm 0,04$	0,95	$\pm 0,04$	0,125	0,879
SOD2	0,89	$\pm 0,05$	1,06	$\pm 0,03$	0,91	$\pm 0,05$	1,04	$\pm 0,04$	0,012	0,080
CATALASE	0,75	$\pm 0,03$	0,79	$\pm 0,02$	0,89	$\pm 0,04$	0,82	$\pm 0,03$	0,229	0,261
PDHe	0,67	$\pm 0,04$	0,74	$\pm 0,03$	1,05	$\pm 0,02$	1,05	$\pm 0,02$	0,113	0,999
HADHA	0,69	$\pm 0,03$	0,73	$\pm 0,01$	0,77	$\pm 0,01$	0,76	$\pm 0,01$	0,348	0,451
HSP60	0,27	$\pm 0,02$	0,35	$\pm 0,01$	0,22	$\pm 0,01$	0,23	$\pm 0,01$	0,009	0,461
G6PDH	1,07	$\pm 0,05$	1,26	$\pm 0,02$	3,93	$\pm 0,20$	3,32	$\pm 0,10$	0,005	0,020

TABLA 21. PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EN CO-CULTIVOS: CAPAN-1.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A: Línea tumoral Capan-1 crecida aisladamente; B: Línea tumoral Capan-1 que ha interactuado con fibroblastos LC5; E: Fibroblastos LC5 crecidos aisladamente; F: Fibroblastos LC5 que han interactuado con Capan-1.

7.5.2. Modelo PL45.

La misma experimentación expuesta anteriormente, se realizó con la línea tumoral pancreática PL45. Se ha estudiado la "firma energética" en la línea tumoral PL45 y en los fibroblastos LC5 en condiciones de co-cultivo y se ha comparado la expresión de las proteínas que constituyen esta firma con su expresión cuando ambas líneas celulares son cultivadas aisladamente.

También, para facilitar el diseño de los gráficos y la interpretación de los resultados, las condiciones estudiadas son codificadas del siguiente modo:

- Condición C: Línea tumoral PL45 crecida aisladamente.

- Condición D: Línea tumoral PL45 que ha interaccionado con fibroblastos LC5.
- Condición E: Fibroblastos LC5 crecidos aisladamente.
- Condición G: Fibroblastos LC5 que han interaccionado con PL45.

Los resultados obtenidos quedan reflejados en la siguiente figura (Figura 64).

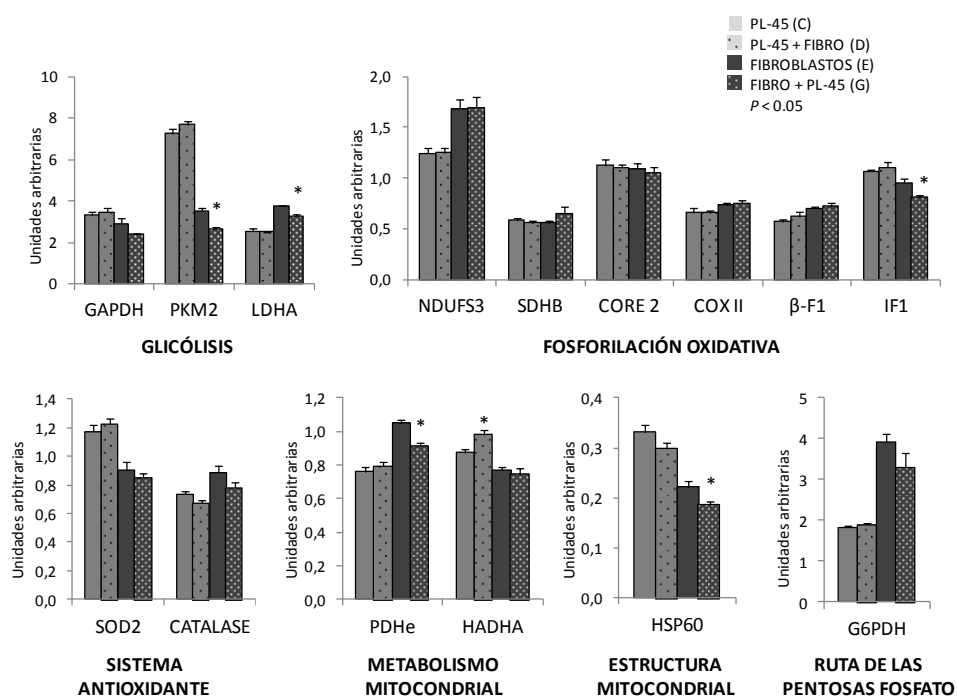


FIGURA 64. PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EN CO-CULTIVOS: PL45

En la línea tumoral pancreática PL45 se ha observado una menor variación en la expresión de las proteínas pertenecientes a esta firma energética. Esta línea tumoral sólo presenta aumentada la expresión de la proteína HADHA, perteneciente al metabolismo mitocondrial, cuando es crecida en presencia de fibroblastos.

En cambio, la línea de fibroblastos LC5 presenta una disminución de seis proteínas pertenecientes a esta firma: PKM2 y LDHA de la glicólisis; IF1 de

la fosforilación oxidativa; PDHe del metabolismo mitocondrial; y la proteína estructural de la mitocondria HSP60.

Los resultados estadísticos quedan reflejados en la Tabla 22.

UNIDADES ARBITRARIAS										
PL-45	MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR DE LA MEDIA (SEM)								T-STUDENT	
	C		D		E		G			
	MEAN	SEM	MEAN	SEM	MEAN	SEM	MEAN	SEM	C vs D	E vs G
GAPDH	3,32	$\pm 0,15$	3,45	$\pm 0,21$	2,92	$\pm 0,25$	2,38	$\pm 0,07$	0,636	0,066
PKM2	7,25	$\pm 0,25$	7,66	$\pm 0,17$	3,52	$\pm 0,14$	2,63	$\pm 0,11$	0,198	0,000
LDHA	2,54	$\pm 0,12$	2,49	$\pm 0,03$	3,76	$\pm 0,05$	3,27	$\pm 0,09$	0,684	0,001
NDUFS3	1,24	$\pm 0,06$	1,25	$\pm 0,04$	1,68	$\pm 0,08$	1,69	$\pm 0,11$	0,898	0,964
SDHB	0,58	$\pm 0,02$	0,56	$\pm 0,02$	0,56	$\pm 0,02$	0,64	$\pm 0,07$	0,405	0,278
CORE 2	1,12	$\pm 0,07$	1,10	$\pm 0,03$	1,09	$\pm 0,05$	1,05	$\pm 0,06$	0,804	0,595
COX II	0,66	$\pm 0,04$	0,65	$\pm 0,03$	0,73	$\pm 0,03$	0,75	$\pm 0,03$	0,932	0,740
β -F1	0,57	$\pm 0,02$	0,62	$\pm 0,04$	0,70	$\pm 0,02$	0,72	$\pm 0,03$	0,268	0,581
IF1	1,07	$\pm 0,02$	1,11	$\pm 0,05$	0,96	$\pm 0,04$	0,81	$\pm 0,02$	0,473	0,009
SOD2	1,17	$\pm 0,05$	1,23	$\pm 0,03$	0,91	$\pm 0,05$	0,85	$\pm 0,03$	0,357	0,393
CATALASE	0,73	$\pm 0,02$	0,68	$\pm 0,02$	0,89	$\pm 0,04$	0,79	$\pm 0,04$	0,090	0,105
PDHe	0,76	$\pm 0,03$	0,79	$\pm 0,03$	1,05	$\pm 0,02$	0,91	$\pm 0,02$	0,411	0,001
HADHA	0,87	$\pm 0,02$	0,98	$\pm 0,03$	0,77	$\pm 0,01$	0,75	$\pm 0,04$	0,010	0,529
HSP60	0,33	$\pm 0,02$	0,30	$\pm 0,01$	0,22	$\pm 0,01$	0,19	$\pm 0,01$	0,107	0,023
G6PDH	1,84	$\pm 0,02$	1,89	$\pm 0,06$	3,93	$\pm 0,20$	3,31	$\pm 0,34$	0,383	0,143

TABLA 22. PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EN CO-CULTIVOS: PL45. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

(C: Línea tumoral PL45 crecida aisladamente; D: Línea tumoral PL45 que ha interactuado con fibroblastos LC5; E: Fibroblastos LC5 crecidos aisladamente; G: Fibroblastos LC5 que han interactuado con PL45)

7.5.3. Análisis comparativo entre co-cultivos.

A continuación se exponen conjuntamente, los resultados obtenidos en esta experimentación en ambas líneas tumorales.

RESULTADOS

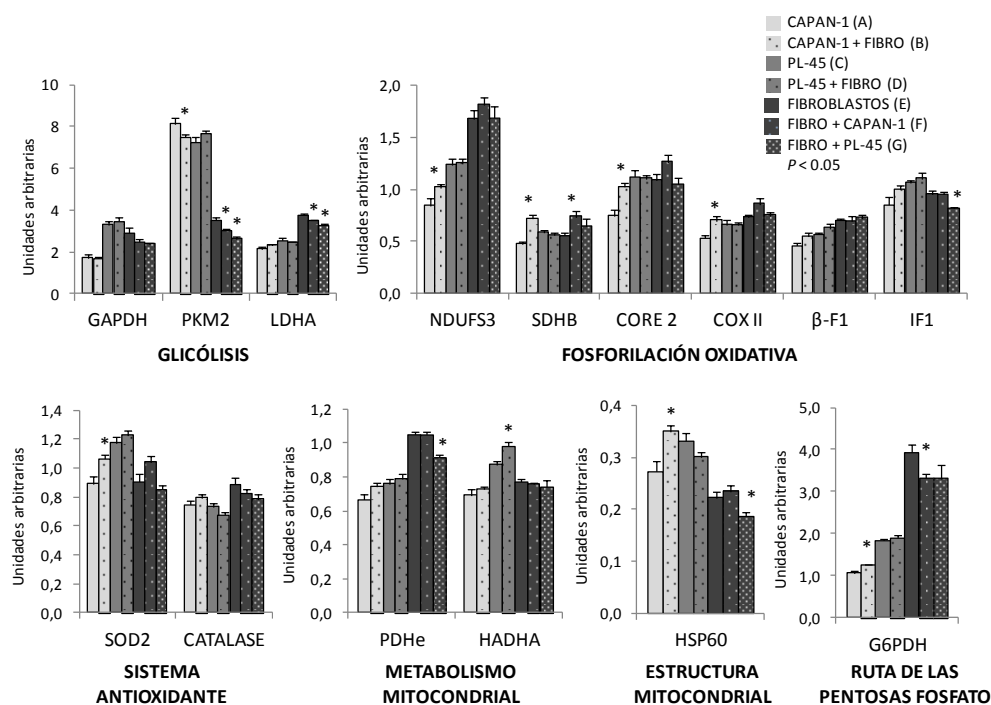


FIGURA 65. PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EN CO-CULTIVOS CAPAN-1 Y PL45.

Como podemos observar en los resultados expuestos anteriormente y según las condiciones experimentales descritas, las líneas tumorales Capan-1 y PL45 modifican la expresión de determinadas proteínas pertenecientes al metabolismo energético celular, de manera distinta.

Capan-1 es la línea tumoral que más modificaciones sufre en la expresión de estas proteínas, aumentando la expresión de NDUFS3, SDHB, CORE2, COXII, SOD2, HSP60 Y G6PDH; y disminuyendo únicamente la expresión de PKM2, en este modelo de co-cultivo con fibroblastos.

PL45 en cambio, únicamente muestra un aumento de la expresión de la proteína HADHA, la cual participa en el metabolismo lipídico mitocondrial.

ARBITRARY UNITS																		
PANCREAS	MEAN ± SEM														T-STUDENT			
	2A		2B		2C		2D		2E		2F		2G					
AC	MEAN	SEM	MEAN	SEM	MEAN	SEM	MEAN	SEM	MEAN	SEM	MEAN	SEM	MEAN	SEM	2A vs 2B	2C vs 2D	2E vs 2F	2E vs 2G
GAPDH	1,71	± 0,16	1,70	± 0,09	3,32	± 0,15	3,45	± 0,21	2,92	± 0,25	2,49	± 0,16	2,38	± 0,07	0,930	0,636	0,179	0,066
PKM2	8,14	± 0,26	7,50	± 0,11	7,25	± 0,25	7,66	± 0,17	3,52	± 0,14	3,04	± 0,06	2,63	± 0,11	0,045	0,198	0,009	0,000
LDHA	2,14	± 0,12	2,34	± 0,02	2,54	± 0,12	2,49	± 0,03	3,76	± 0,05	3,51	± 0,05	3,27	± 0,09	0,148	0,684	0,007	0,001
NDUFS3	0,85	± 0,06	1,02	± 0,04	1,24	± 0,06	1,25	± 0,04	1,68	± 0,08	1,82	± 0,07	1,69	± 0,11	0,049	0,898	0,254	0,964
SDHB	0,48	± 0,01	0,72	± 0,04	0,58	± 0,02	0,56	± 0,02	0,56	± 0,02	0,73	± 0,05	0,64	± 0,07	0,000	0,405	0,011	0,278
CORE 2	0,74	± 0,06	1,02	± 0,04	1,12	± 0,07	1,10	± 0,03	1,09	± 0,05	1,26	± 0,07	1,05	± 0,06	0,003	0,804	0,075	0,595
COX II	0,53	± 0,03	0,69	± 0,05	0,66	± 0,04	0,65	± 0,03	0,73	± 0,03	0,86	± 0,06	0,75	± 0,03	0,016	0,932	0,087	0,740
β-F1	0,46	± 0,03	0,54	± 0,05	0,57	± 0,02	0,62	± 0,04	0,70	± 0,02	0,69	± 0,04	0,72	± 0,03	0,140	0,268	0,822	0,581
IF1	0,85	± 0,08	1,00	± 0,04	1,07	± 0,02	1,11	± 0,05	0,96	± 0,04	0,95	± 0,04	0,81	± 0,02	0,125	0,473	0,879	0,009
SOD2	0,89	± 0,05	1,06	± 0,03	1,17	± 0,05	1,23	± 0,03	0,91	± 0,05	1,04	± 0,04	0,85	± 0,03	0,012	0,357	0,080	0,393
CATALASE	0,75	± 0,03	0,79	± 0,02	0,73	± 0,02	0,68	± 0,02	0,89	± 0,04	0,82	± 0,03	0,79	± 0,04	0,229	0,090	0,261	0,105
PDHe	0,67	± 0,04	0,74	± 0,03	0,76	± 0,03	0,79	± 0,03	1,05	± 0,02	1,05	± 0,02	0,91	± 0,02	0,113	0,411	0,999	0,001
HADHA	0,69	± 0,03	0,73	± 0,01	0,87	± 0,02	0,98	± 0,03	0,77	± 0,01	0,76	± 0,01	0,75	± 0,04	0,348	0,010	0,451	0,529
HSP60	0,27	± 0,02	0,35	± 0,01	0,33	± 0,02	0,30	± 0,01	0,22	± 0,01	0,23	± 0,01	0,19	± 0,01	0,009	0,107	0,461	0,023
G6PDH	1,07	± 0,05	1,26	± 0,02	1,84	± 0,02	1,89	± 0,06	3,93	± 0,20	3,32	± 0,10	3,31	± 0,34	0,005	0,383	0,020	0,143

TABLA 23. PROTEÍNAS DE METABOLISMO ENERGÉTICO EN CO-CULTIVOS CAPAN-1 Y PL45. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

A: Línea tumoral Capan-1 crecida aisladamente; B: Línea tumoral Capan-1 que ha interaccionado con fibroblastos LC5.

C: Línea tumoral PL45 crecida aisladamente; D: Línea tumoral PL45 que ha interaccionado con fibroblastos LC5.

E: Fibroblastos LC5 crecidos aisladamente; F: Fibroblastos LC5 que han interaccionado con Capan-1; G: Fibroblastos LC5 que han interaccionado con PL45.

Con respecto a la línea de fibroblastos LC5, en ambos condiciones de co-cultivo presenta una disminución de la expresión de las proteínas PKM2 y LDHA pertenecientes a la ruta glucolítica. De manera diferencial, cuando crece en co-cultivo con la línea tumoral Capan-1, aumenta su expresión proteica de SDHB y disminuye la de G6PDH. Sin embargo, cuando el co-cultivo es con PL45, disminuye la expresión de las proteínas IF1, PDHe y HSP60.



Discusión.

8. DISCUSIÓN.

El presente trabajo muestra que el co-cultivo de células tumorales de cáncer de páncreas con fibroblastos humanos es viable y representa un modelo experimental eficiente y válido para generar hipótesis biológicas.

El proceso induce un incremento precoz de la capacidad de migración de las células tumorales y de los fibroblastos.

Estudios de caracterización fenotípica de CAFs llevados a cabo por diversos autores, sugieren un aumento en la expresión de α -SMA en los fibroblastos cuando éstos son activados por células tumorales, tanto en condiciones de co-cultivo directo como indirecto (38, 99-102). Estos CAFs, miofibroblastos o fibroblastos activados adquieren, durante este proceso, fibras de estrés contráctiles, cambiando su fenotipo y expresando *de novo* la actina α de músculo liso (α -SMA) (99, 101), siendo por tanto ésta, uno de los principales marcadores de activación de fibroblastos. En los fibroblastos, los estudios de Western-Blot muestran que se produce un aumento en la expresión de α -SMA.

El Factor de Crecimiento del Queratinocito Humano (*Human Keratinocyte Growth Factor, KGF*), también conocido como Factor de Crecimiento Fibroblástico (*Fibroblast Growth Factor 7, FGF-7*) es un miembro de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos, actualmente compuesta por 18 moléculas (103). Diversos autores sugieren que KGF tiene un efecto paracrino sobre diferentes tipos celulares epiteliales, estimulando su proliferación. De este modo, los fibroblastos asociados a tumor (CAF) tienen un importante papel en el inicio y desarrollo de muchos tipos de tumores sólidos, incrementando la viabilidad de las células tumorales y promoviendo su proliferación y capacidad migratoria a otros órganos. Diversos estudios muestran que los CAF también tienen por característica el incremento de la secreción de KGF, comparada con

la de fibroblastos normales no activados por células tumorales (101, 104, 105).

Nuestro estudio detectó un incremento de la secreción de FGF-7 (KGF) en el medio de co-cultivo de los fibroblastos con células tumorales.

En las células epiteliales de la línea Capan-1 co-cultivadas con fibroblastos pudimos demostrar una disminución de la expresión de E cadherina, que es una característica de la transición epitelio-mesenquimal. Este hallazgo es más interesante si tenemos en cuenta que en esta línea existe una mutación en *SMAD4* que genera la pérdida de expresión de la proteína, lo cual implica una imposibilidad de activar la ruta canónica de TGF- β . Por lo tanto, la activación de EMT en esta línea celular, o no está mediada por TGF- β o, de estarlo, se activan mecanismos alternativos de transmisión de señales.

Desde el punto de vista proteómico se han podido demostrar cambios relevantes, que son diferentes en función de la línea celular del estudio y de sus condiciones de cultivo (Tabla 25).

En la línea celular tumoral Capan-1, de un total de 1336 *spots* proteicos, un 2% experimentan una disminución y un 2.7 % un incremento cuando las células crecen conjuntamente con fibroblastos LC5, comparadas con cuando se cultivan en solitario. También hay cambios en el proteoma de las células Capan-1 cuando crecen en medio condicionado producido por un cultivo de fibroblastos LC5, aunque esta variación es más discreta (0.8% disminuyen y 0.4% aumentan). En la línea tumoral PL45, el cambio en el proteoma afecta a un menor número de proteínas: de un total de 1310 *spots*, 0.2% decrecen y 1.6% incrementan, cuando las células crecen en co-cultivo con fibroblastos. Resulta interesante conocer que la disminución es mayor cuando las células crecen con medio condicionado de fibroblastos (1.1%).

Con respecto a los fibroblastos, en los modelos de co-cultivo con células Capan-1, el DIGE detecta un 0.4% de *spots* que disminuyen y un 0.4% de

spots que aumentan de un total 4932 *spots*. En los modelos de co-cultivo con células PL45, de un total de 4667 *spots*, 0.5% incrementan y 0.6% decrecen su abundancia.

El presente trabajo ha permitido identificar un total de 19 proteínas que varían en las células epiteliales, y 14 en los fibroblastos (Tabla 25).

Este número de proteínas identificadas, aparentemente, no es muy grande, lo cual podría cuestionar la idoneidad del método utilizado, sobre todo si no tenemos una referencia acerca de la variación que se espera encontrar. En este sentido, se han publicado los resultados de un estudio del análisis global de la expresión génica, mediante *arrays* de DNA, en células de cáncer de páncreas humano (CFPAC1) co-cultivadas durante 48 h con fibroblastos humanos. Se generaron 4 muestras: células tumorales CFPAC1 cultivadas en solitario y en co-cultivo; fibroblastos cultivados en solitario y con células tumorales. En dicho estudio se identificaron un total de 718 transcritos basándose en la expresión diferencial de los mismos entre las 4 muestras. Se realizaron análisis jerarquizados, que distinguieron claramente 2 *clusters* que se solaparon con la estirpe celular de procedencia de los transcritos (células epiteliales frente a fibroblastos). Para cada estirpe, sólo una pequeña proporción de genes cambió en la condición de co-cultivo vs mono-cultivo. Así, en las células tumorales, de un total de 18462 transcritos, sólo 55 (0.3%) incrementaron su expresión en más de 3 veces con el co-cultivo, mientras que 48 (0.48%) vieron su expresión disminuida en más de 3 veces. En los fibroblastos co-cultivados con las células tumorales, se pudieron identificar 43 transcritos (0.23%) que estaban sobre-expresados al menos 3 veces y 31 (0.17%) cuya expresión estaba disminuida en al menos 3 veces, con respecto a los fibroblastos crecidos en mono-cultivo. Los autores postularon que esta pequeña cantidad de genes diferencialmente expresados puede ser suficiente para los cambios fenotípicos observados (106).

Otros dos estudios más recientes, que utilizan técnicas proteómicas para analizar las modificaciones que experimenta una línea celular de cáncer de páncreas sometida a diferentes tipos de estrés, identifican un máximo de 9 proteínas diferencialmente expresadas (107, 108).

Por todo lo anterior, el número de proteínas identificadas en nuestro trabajo está en el rango de lo que cabría esperar mediante técnicas genómicas y proteómicas.

Desde el punto de vista cualitativo, las proteínas identificadas en cada una de las estirpes seleccionadas generan la hipótesis que los sistemas de adaptación celular al co-cultivo son diferentes.

En la línea Capan-1, el análisis KEGG indica que las proteínas que disminuyen participan en uniones entre células epiteliales (α -actinina-4), mientras que se incrementan las relacionadas con migración e invasión (anexina A2, filamina B), lo cual habla a favor de una pérdida de polaridad ápico-basal y de cohesión entre células epiteliales y la adquisición de un fenotipo menos epitelial. Así mismo destaca el incremento de la proteína de estrés térmico HSP60, que sugiere la necesidad de mantener la funcionalidad de proteínas críticas sometidas a modificaciones secundarias al metabolismo celular. Estos cambios son mayores en las células crecidas en co-cultivo, comparado con las células que se cultivan en medio condicionado de fibroblastos. La razones para explicar este fenómeno puede ser bien que el co-cultivo acelere el consumo de nutrientes del medio, generando así estrés celular, o bien que existe una secreción yuxtacrina de factores que requiere la proximidad física de las dos estirpes celulares. El papel de la prelamina A/C en el fenotipo agresivo del tumor no está claro y los datos publicados son contradictorios.

PL45, la línea sin mutación en SMAD, pero que comparte mutaciones activadoras en KRAS, adquiere unos cambios muy diferentes. Algunos de los cambios (*Heat shock cognate 71 kDa protein*) aparecen en las células

tumorales cultivadas en las dos condiciones (co-cultivo y medio condicionado) y son muy interesantes porque son consecuencia de la activación de las proteínas SMADs, lo cual sugiere una transmisión de señales inducida por TGF- β . Al igual que con las células Capan-1, los cambios son mucho mayores en el modelo de co-cultivo directo y reflejan una adaptación de la célula para el anabolismo proteico (factor de elongación 2), mantenerlas funcionales (HSPs, fosfoproteína 1 inducida por estrés), o eliminarlas/extruir las (ATPasa del retículo endoplasmático de transición, proteína 78 kDa regulada por glucosa). También destaca que la célula se adapte a una situación de daño de DNA (ATPasa del retículo endoplasmático de transición y XRCC6) y que precise un incremento de proteínas relacionadas con el metabolismo monocarbonado. Esto último puede estar implicado en la disponibilidad de grupos metilo tanto para la síntesis de nucleótidos, como la de aminoácidos (metionina), como para la regulación epigenética de la expresión génica. La célula también adquiere un fenotipo migratorio que requiere cambios en la cantidad de algunas proteínas (Radixina, Anexina A2) . Dado el aumento de proteínas relacionadas con el tráfico de moléculas mediado por retículo endoplasmático, es posible que esta célula incremente la producción de exosomas, que podrían comportarse como elementos de "comunicación" intercelular con los fibroblastos.

Las 14 proteínas que varían en los fibroblastos participan en varios sistemas. De forma global, los fibroblastos incrementan la cantidad de tubulinas y de anexinas, que están implicadas en varios procesos como el de la endocitosis de fagosomas o el establecimiento de uniones *gap*. Uno y otro pueden ser mecanismos por los cuales se facilita la entrada de moléculas del medio intercelular que contengan moléculas liberadas por las células epiteliales.

Los fibroblastos que crecen condicionados directa o indirectamente por las células tumorales Capan-1 incrementan la cuantía de α -actinina-1, lo que les capacita para incrementar la cohesión intercelular, que es una

característica epitelial. No obstante también incrementan la cantidad de vimentina, implicada en la organización del citoesqueleto y del transporte de macromoléculas, que capacita a las células mesenquimales para migrar e invadir. Llama la atención que estos fibroblastos necesiten modificar la cuantía de proteínas relacionadas con el metabolismo, como se verá más adelante, y de incrementar los niveles de adenosil homocisteinasa, enzima que participa en la síntesis de S-adenosil metionina (SAM), y por lo tanto en la regulación epigenética de la expresión génica.

Estudios de otros grupos, mencionados anteriormente, han analizado estas modificaciones moleculares utilizando otras aproximaciones. El estudio que analizó los cambios en expresión génica (*arrays* de DNA) de células de cáncer de páncreas humano (CFPAC1) co-cultivadas con fibroblastos humanos concluyó que los genes sobre-expresados por la célula tumoral eran COX-2, hialuronan sintasa 2, MMP-1, factor *trefoil* 1 (106). Se detectó un gen infraexpresado, gravina. Se postuló que este perfil de expresión génica podría explicar el incremento de la capacidad de las células tumorales para la motilidad e invasión (106). El único gen cuyo producto de expresión puede relacionarse con las proteínas identificadas en nuestro estudio es COX-2. Esta enzima está implicada en la síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico. Este se obtiene a partir de los fosfolípidos de membrana por medio de la fosfolipasa A2. La Anexina A2, incrementada en la línea Capan 1, se une a fosfolípidos de membrana de manera dependiente de Ca^{2+} , participando en procesos de motilidad, endo y exocitosis e invasión mediante remodelado de membrana y anclaje de proteínas a la misma. Su papel pronóstico en cáncer es controvertido (109, 110).

Con respecto a los fibroblastos co-cultivados con las células tumorales, el citado estudio validó 5 genes sobre-expresados: Anexina 14, MCP-1 (proteína quimioatrayente del monocito-1), interleuquina-8 (IL-8), GRO-1 (oncogén-1 regulado por crecimiento) y COX2. Resultó interesante el que

3 de ellos expresen productos que son miembros de la subfamilia de quimioquinas CXC/CC: MMP-1 (CCL2), IL-8 (CXCL8), GRO1 (CXCL1). Estas quimioquinas pueden promover invasión, metástasis y angiogénesis (106). Nuestros resultados vuelven a compartir, una vez más, un incremento en la expresión de otro miembro de la familia de Anexinas, en este caso la Anexina A1, en fibroblastos co-cultivados con PL45. Resultó llamativo el que no se detectase ningún gen relacionado con colágeno, fibronectina o TGF- β (106).

Otros dos estudios recientemente publicados por un mismo equipo investigador utilizan un enfoque proteómico similar al nuestro, para caracterizar cambios experimentados por células tumorales de cáncer de páncreas, sometidas a diferentes condiciones de estrés celular. El primero de ellos analiza los perfiles proteómicos de dos líneas celulares derivadas de la línea de cáncer de páncreas KLM1, primariamente sensible a gemcitabina (108). Las líneas difirieron en el tipo de estrés celular al que fueron sometidas: la línea KLM1-R desarrolló resistencia a la gemcitabina por exposición al fármaco en el medio de cultivo, mientras que la línea KLM1-S se desarrolló en medios de cultivo empobrecidos en factores de crecimiento.

Este estudio identificó 6 proteínas diferencialmente expresadas: ATPasa del retículo endoplásmico de transición, PDZ y LIM proteína 1, calmodulina, lamina A/C, HSP60 y enolasa. De las 6, se validaron las tres últimas por *western blot*. Dichas proteínas fueron más abundantes en las células KLM1-S comparadas con KLM1-R, lo que indicó que estas células utilizaron mecanismos de supervivencia que dependieron de la vía PI3K/Akt. Nuestros resultados se solapan con algunos de los hallazgos de estos investigadores, en concreto porque coinciden en la identificación de la ATPasa del retículo endoplasmático de transición y la HSP60.

De forma más relevante para interpretar nuestro trabajo, el mismo grupo de investigadores publicó los resultados de la comparación entre el perfil proteómico de las células KLM1-S cultivadas en un medio empobrecido

en factores de crecimiento, con la original KLM1, cultivada en condiciones óptimas (107). Su objetivo fue tratar de generar unas condiciones de estrés similares a las que la célula tumoral debe tener cuando crece en el estroma tumoral, en cuanto a competencia por nutrientes. De hecho, en el proceso de depleción de factores del medio de cultivo, el porcentaje de células KLM1 supervivientes fue pequeño y sus características morfológicas cambiaron, para adoptar una morfología irregular (con algunas células con aspecto senescente), incremento de resistencia al estrés, quimiorresistencia indirecta a gemcitabina y un perfil proteómico diferente en 20 proteínas. Los autores postularon que el pequeño pero recurrente porcentaje de células senescentes podrían estar incrementando la tasa de proliferación, migración e invasión del resto de células KLM1-S. Otros autores han demostrado que células premalignas incrementan su potencial invasor cuando son cultivadas con fibroblastos senescentes o en su medio condicionado (40).

Proteína	Ratio
14-3-3 sigma	+3.3
Reticulocalbina 1	+3.8
Proteín disulfuro isomerasa	+4.8
Proteína 78 KDa regulada por glucosa	+3.1
HSP 60	+5.4
Fosfoproteína inducida por estrés	+5.2
Enolasa	-2.4
Gliceraldehido 3 -P -deshidrogenasa	-2.2
Gliceraldehido 3 -P -deshidrogenasa	-4.0

TABLA 24. PROTEÍNAS QUE VARÍAN EN LÍNEA SOMETIDA A ESTRÉS, RESPECTO A LÍNEA PARENTAL EN CONDICIONES ÓPTIMAS DE CULTIVO (107).

El estudio proteómico reveló diferencias en la abundancia de 20 proteínas, de las que 14 aumentaban y 6 disminuían en las células KLM1-S respecto a la línea original. Se lograron identificar 8, todas las cuales han sido previamente asociados a incremento de supervivencia del cáncer

en condiciones de estrés celular o de quimiorresistencia y varias de las cuales se han identificado también en nuestro trabajo.

La Fosfoproteína 1 inducida por estrés se ha descrito incrementada tanto en líneas celulares como en muestras de pacientes con cáncer de páncreas. Esta co-chaperona se une tanto a HSP70 como a HSP90, y aunque no se conoce su papel pronóstico en el cáncer de páncreas, se relaciona con su capacidad de invasión (111).

Aunque se ha encontrado que varios tumores pueden tener sobre-expresada la proteína de 78 kDa relacionada con glucosa, sólo un estudio previo la detectó en cáncer de páncreas. Esta proteína confiere resistencia a estrés y la protege de la apoptosis inducida por varios agentes quimioterapéuticos (112).

No hay demasiada información sobre el papel de HSP60 en cáncer de páncreas (113). Sin embargo, el aumento de esta proteína ha sido relevante en nuestros modelos y en los de Baron et al (107).

Nuestro estudio no detectó variaciones en $14\text{-}3\text{-}3\sigma$, que suele estar sobre-expresada en cáncer de páncreas y se relaciona con la resistencia a fármacos (entre ellos gemcitabina) y a radioterapia. Esto puede deberse al sesgo del propio diseño experimental de este grupo, que partió de una línea celular primariamente sensible a gemcitabina.

En modelos multicelulares, la cooperación celular es un proceso concomitante con la organización celular. A lo largo de la vida animal, desde el desarrollo embrionario hasta la homeostasis tisular, y en situaciones fisiopatológicas como el cáncer, las células dependen del intercambio de información para coordinar sus acciones. Una manera de hacerlo es mediante la comunicación directa. En metazoos, esta comunicación se consigue mediante las uniones gap, estructuras de 20-30 Angstroms inicialmente descritas en células del hígado y músculo cardíaco del ratón. Son canales que permiten el intercambio de pequeñas moléculas e iones. En los cordados, las proteínas involucradas

en estas uniones se llaman conexinas. Seis unidades de conexinas forman un conexon, o hemicanal, que se une al conexón de la célula vecina para permitir la comunicación (114).

Además de funciones como canales de transporte, las conexinas participan en la adhesión, migración celular e interaccionan con moléculas de señalización, como las tubulinas y la actina. Aunque inicialmente se pensó que en cáncer existe una disminución de expresión de las conexinas, evidencias recientes ponen de manifiesto que en la tumorigénesis se cambia el perfil de afinidad de las conexinas, con pérdida de interacciones con el tejido parental y adquisiciones de nuevas relaciones (114).

El otro sistema de comunicación que cada vez es foco de más atención es el de los exosomas. Los exosomas son vesículas derivadas de células, de entre 30 y 100 nm, liberados por la célula cuando el cuerpo multivesicular se fusiona a la membrana citoplasmática. Los exosomas pueden contener proteínas y RNA, incluyendo miRNA. Los tumores sometidos a hipoxia secretan exosomas con capacidad pro-angiogénica que promueven la progresión del potencial maligno del tumor (115). Hay evidencias indirectas de que las células PL45 incrementan la expresión de proteínas relacionadas con la movilización de proteínas de membrana del retículo endoplásmico y otras relacionadas con los procesos de tráfico de vesículas, endo- y exocitosis, por lo que postulamos la hipótesis de que los exosomas pueden estar teniendo un papel en la modulación de la interacción epitelio-mesenquimal.

TABLA 25. PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS (DIGE) EN LAS LÍNEAS CELULARES ESTUDIADAS: LISTADO ALFABÉTICO Y DESCRIPCIÓN FUNCIONAL.

Listado alfabético de los cambios diferenciales del proteoma identificados en cada línea celular, dependiendo de las condiciones de cultivo, y comenta brevemente la función biológica de las proteínas así seleccionadas.

La cabecera de la tabla identifica los modelos de cultivo y el cultivo de referencia de la siguiente manera:

- Capan-1 ó PL45 + LC5: co-cultivos directos. La referencia son los mono-cultivos de Capan-1 o PL 45, respectivamente
- Capan-1 ó PL45 (LC5): cultivos de células epiteliales tumorales con medio condicionado (secretoma) de LC5. La referencia son los mono-cultivos de Capan-1 o PL45, respectivamente
- LC5 + Capan-1 ó PL45: co-cultivos directos de fibroblastos con líneas de células tumorales. La referencia son los monocultivos de fibroblastos LC5
- LC5 + (Capan-1 ó PL45): cultivos de fibroblastos con medio condicionado (secretoma) de Capan-1 ó PL45. La referencia son los mono-cultivos de fibroblastos LC5.

Proteína	Descripción	Células tumorales				Fibroblastos			
		<u>Capan-1</u> + LC5	<u>Capan-1</u> (LC5)	<u>PL45</u> + LC5	<u>PL-45</u> (LC5)	<u>LC5</u> + Capan-1	<u>LC5</u> (Capan-1)	<u>LC5</u> + PL45	<u>LC5</u> (PL45)
α-actinina-4 (116-119)	Enlaces cruzados entre filamentos de actina. Conecta actina a estructuras intracelulares. Tráfico intracelular de vesículas. Ensamblaje de uniones estrechas. Interacciona con cateninas y cadherinas. Coactivador transcripcional, mediado por PPAR- γ y RAR- α								

Proteína	Descripción	Células tumorales				Fibroblastos			
		<u>Capan-1</u> + <u>LC5</u>	<u>Capan-1</u> (LC5)	<u>PL45</u> + <u>LC5</u>	<u>PL-45</u> (LC5)	<u>LC5</u> + <u>Capan-1</u>	<u>LC5</u> (Capan-1)	<u>LC5</u> + <u>PL45</u>	<u>LC5</u> (PL45)
Actina citoplasmática 1 (120)	Motilidad celular y mantenimiento del citoesqueleto. Las α -actinas son musculares y componentes principales del aparato contráctil. Las actinas β y γ son ubicuas. La actina γ 1 citoplasmática se encuentre en células no-musculares.								
Adenosil homocisteinasa (121)	Inhibe por competencia por sustrato las reacciones metil transferasa dependientes de SAM (S-adenosil-metionina). Crítico en la regulación de la metilación.								
Anexina A1 (122)	Promueve fusiones de membrana. Implicada en exocitosis. Proteína que se une a fosfolípidos y a Ca^{2+} . Regula fosfolipasa A2.								
Anexina A2 (109, 110)	Proteína que se une a fosfolípidos de manera Ca^{2+} dependiente. Pleiotrópica. Motilidad celular (sobre todo epitelial). Enlaza complejos proteicos asociados a membrana con el citoesqueleto de actina. Organiza exo- y endocitosis. Fibrinólisis. Formación de canales iónicos. Aumenta en hipoxia. El tetrámero promueve invasión.								
ATP sintasa mitocondrial (123-125)	ATP sintetasa de membrana mitocondrial (Complex V). Genera ATP en presencia de gradiente transmembrana de protones.								
ATPasa del retículo endoplásmico	Necesario para la fragmentación y re-ensamblaje del aparato de Golgi durante la mitosis. Implicado en la formación del RE								

Proteína	Descripción	Células tumorales				Fibroblastos			
		<u>Capan-1</u> + <u>LC5</u>	<u>Capan-1</u> (LC5)	<u>PL45</u> + <u>LC5</u>	<u>PL-45</u> (LC5)	<u>LC5</u> + <u>Capan-1</u>	<u>LC5</u> (Capan-1)	<u>LC5</u> + <u>PL45</u>	<u>LC5</u> (PL45)
transicional (126)	de transición. La transferencia de membranas de vesículas al aparato de Golgi es un proceso ATP dependiente. Regula E3 ubiquitin-protein ligasa y participa en la extrusión de proteínas defectuosas para ser degradadas en el proteasoma citosólico. Implicada en respuesta a Daño DNA de doble cadena facilitando la concentración de proteínas reparadoras en el entorno de la lesión. Necesaria para la degradación proteosómica de proteínas degradadas de la membrana mitocondrial.								
C-1 Tetrahydrofolato sintasa, citoplásmica (127)	Participa en la conversión de tetrahydrofolatos y en el metabolismo monocarbonado. Cataliza tres reacciones secuenciales en la interconversión de derivados monocarbonados de los folatos: 5,10-metilen-tetra-hidrofolato deshidrogenasa, 5,10-metenil-tetrahydrofolato ciclohidrolasa y 10-formiltetrahydrofolato sintetasa. Regula la producción de sustratos para la metionina, timidilato y la síntesis de novo de las purinas.								
Factor de elongación 2 (128)	Cataliza la traslocación ribosomal durante la fase de elongación de la traducción, así como el movimiento coordinado de las moléculas de tRNA, mRNA y los cambios conformacionales del ribosoma.								

Proteína	Descripción	Células tumorales				Fibroblastos			
		<u>Capan-1</u> + LC5	<u>Capan-1</u> (LC5)	<u>PL45</u> + LC5	<u>PL-45</u> (LC5)	<u>LC5</u> + Capan-1	<u>LC5</u> (Capan-1)	<u>LC5</u> + PL45	<u>LC5</u> (PL45)
Filamina B (129-134)	Regulan locomoción celular y se asocian a procesos de transmisión de señal. Conecta componentes de membrana con el citoesqueleto de actina y puede promover la ramificación ortogonal de los filamentos de actina. Sobre-expresada en células tumorales muy invasivas.								
Fosfoproteína 1 inducida por estrés (111, 135)	Media la asociación de las chaperonas HSC70 y HSP90								
Glucosa 6 Fosfato deshidrogenasa (136)	Cataliza la etapa limitante de la vía oxidativa de las pentosas fosfato. Proporciona reductores (NADPH) y pentosas fosfato para la síntesis de ácidos grasos y de ácidos nucleicos.								
Heat shock cognate 71 Kda (137-139)	Represor de activación transcripcional. Inhibe la actividad del coactivador transcripcional CITED1 en presencia de activación de SMAD. Chaperona. Componente de complejos del spliceosoma. Requerido para activar splicing mRNA. Se une a lipopolisacárido bacteriano y media su respuesta inflamatoria. Participata en la degradación asociada a retículo endoplásmico de proteínas defectuosas.								
HSP β-1 (128, 140, 141)	Se induce y trasloca al núcleo por estrés y desarrollo celular. Implicada en resistencia al estrés y en organización de actina.								
HSP60,	Implicada en la importación de proteínas mitocondriales y el								

Proteína	Descripción	Células tumorales				Fibroblastos			
		<u>Capan-1</u> + LC5	<u>Capan-1</u> (LC5)	<u>PL45</u> + LC5	<u>PL-45</u> (LC5)	<u>LC5</u> + Capan-1	<u>LC5</u> (Capan-1)	<u>LC5</u> + PL45	<u>LC5</u> (PL45)
mitocondrial (107, 113, 142-145)	ensamblaje de macromoléculas. Puede facilitar su plegamiento correcto. Puede prevenir o reparar plegamientos o ensamblajes incorrectos realizados en la matriz mitocondrial en circunstancias de estrés.								
HSP70 1A/1B (146)	Miembro de la familia de proteína de estrés térmico de 70 KDa. Estabiliza proteínas existentes contra su agregación y media el plegamiento de las recién producidas. Implicada en el sistema ubiquitin-proteasoma. Es un receptor post adhesión del rotavirus, media su entrada. Participa en la degradación de FOXP3 en células T reguladoras durante la inflamación.								
Inhibidor de la elastasa leucocitaria (147)	SERPINA B1 -Regula la actividad de las proteasas de los neutrófilos, catepsina G, proteinasa-3, quimada, quimiotripsina y kalikreína-3. Inhibidor intracelular de Granzima H.								
PCNA (Proliferating Cell Nuclear antigen) (148-150)	Proteína auxiliar de la DNA polimerasa delta. Implicada en el control de la replicación de DNA en eucariotas, incrementando la capacidad de proceso de la DNA polimerasa durante la elongación de la hebra conductora. Papel crítico en la respuesta a daño de DNA. Actúa como plataforma reclutadora de proteínas de reparación de DNA.	Disminuye en fibroblastos LC5 co-cultivados con Capan-1 respecto a cultivo con secretoma de Capan-1							
Peptidil-prolil cis-	Acelera el plegamiento de proteínas. Cataliza la isomerización								

Proteína	Descripción	Células tumorales				Fibroblastos		
		<u>Capan-1</u> + <u>LC5</u>	<u>Capan-1</u> (<u>LC5</u>)	<u>PL45</u> + <u>LC5</u>	<u>PL-45</u> (<u>LC5</u>)	<u>LC5</u> + <u>Capan-1</u>	<u>LC5</u> (<u>Capan-1</u>)	<u>LC5</u> + <u>PL45</u>
trans isomerasa B (151)	cis-trans de las prolinas con enlaces imido dentro de oligopéptidos.							
Peroxi-redoxina-2 (152, 153)	Implicada en la regulación redox de la célula. Reduce peróxidos provenientes del sistema de la tio-redoxina, pero no del de la glutaredoxina. Probablemente importante en eliminar peróxidos generados durante el metabolismo. Podría participar en la señalización de factores de crecimiento y de TNF- α mediante la regulación del contenido intracelular de H ₂ O ₂ .	Aumenta en fibroblastos LC5 co-cultivados con PL45 respecto a cultivo con secretoma de PL45						
Peróxido reductasa mitocondrial dependiente de tioredoxina (152)	Regulador redox. Protege enzimas sensibles a ROS. Regula la activación citosólica de NF-kappa- β .							
Piruvato Kinasa PKM (154-158)	Enzima glicolítico. Genera ATP por transferencia de un fosforilo de fosfoenolpiruvato al ADP. Estimula activación transcripcional. Participa en muerte celular independiente de caspasas. El ratio entre la forma tetramérica activa y el dímero hipoactivo determina el destino de los carbonos de la glucosa e la proliferación y supervivencia de la célula.							

Proteína	Descripción	Células tumorales				Fibroblastos			
		<u>Capan-1</u> + LC5	<u>Capan-1</u> (LC5)	<u>PL45</u> + LC5	<u>PL-45</u> (LC5)	<u>LC5</u> + Capan-1	<u>LC5</u> (Capan-1)	<u>LC5</u> + PL45	<u>LC5</u> (PL45)
Prelamina A/C (159)	Son componentes de la lamina, capa fibrosa de la cara nucleoplasmática de la membrana nuclear interna y estructura sobre la que se organiza la envoltura nuclear. Interacciona con la cromatina y puede participar en su organización, así como en la dinámica de los telómeros. Puede acelerar la senescencia en células de músculo liso.								
Proteín disulfuro isomerasa A3 (160, 161)	Cataliza la formación, degradación y el reordenamiento de los enlaces disulfuro en las proteínas, en el retículo endoplasmático. Tiene actividad chaperona de proteínas. Probablemente involucrada en la supervivencia y progresión de algunos tumores.	Aumenta en fibroblastos LC5 co-cultivados con PL45 respecto a cultivo con secretoma de PL45							
Proteína 1 del complejo T, subunidad ε (162)	Chaperona; Facilita el plegamiento de proteínas, entre otras actina y miosina. Participa en el ensamblaje del BBSoma, un complejo implicado en la ciliogénesis, regulando el transporte de vesículas hasta los cilios.								
Proteína de estrés 70, mitocondrial (163)	Implicada en el control de la proliferación y envejecimiento celular. Puede actuar como chaperona.								
Proteína regulada por glucosa 78 kDa	Facilita ensamblaje de proteínas multiméricas dentro del retículo endoplásmico rugoso. Implicada en control o degradación de proteínas según su estado conformacional.								

Proteína	Descripción	Células tumorales				Fibroblastos			
		<u>Capan-1</u> + <u>LC5</u>	<u>Capan-1</u> (LC5)	<u>PL45</u> + <u>LC5</u>	<u>PL-45</u> (LC5)	<u>LC5</u> + <u>Capan-1</u>	<u>LC5</u> (Capan-1)	<u>LC5</u> + <u>PL45</u>	<u>LC5</u> (PL45)
(112, 164-166)									
40S proteína ribosomal SA (167)	Proteína con dominio transmembrana. Abundante en citoplasma, presente en núcleo, multifuncional. Precursor del receptor de laminina. Participa en adhesión a membrana basal y en la consiguiente transmisión de señales, Participa en angiogénesis y morfogénesis tisular. Receptor de proteínas de priones, promueve su endocitosis. Receptor de determinados patógenos microbianos. Requerido para el ensamblaje y/o estabilidad de subunidad 40S ribosomal.								
Proteín-glutamina gamma-glutamil transferasa 2 (168-170)	Cataliza el ligamiento cruzado de proteínas y la conjugación de poliaminas a proteínas.								
Radixina (171)	Implicada en la unión de actina a la membrana plasmática.								
Tubulina, familia (172)	Familia de proteínas globulares de 55 Kdalton, formada por las tubulinas α , β y γ . Comparten una identidad entre sus cadenas de aminoácidos de 35-40%, aunque su similitud con cualquier otra proteína conocida es mínima. Las tubulinas α y β son las subunidades esenciales de los microtúbulos, mientras que la								

Proteína	Descripción	Células tumorales				Fibroblastos			
		<u>Capan-1</u> + LC5	<u>Capan-1</u> (LC5)	<u>PL45</u> + LC5	<u>PL-45</u> (LC5)	<u>LC5</u> + Capan-1	<u>LC5</u> (Capan-1)	<u>LC5</u> + PL45	<u>LC5</u> (PL45)
	tubulina-γ es un componente fundamental del centrosoma. Se une a GTP.								
• Tubulina cadena β									
• Tubulina cadena α1b									
• Tubulina cadena α1c									
Vimentina (173, 174)	Filamentos intermedios de clase-III. Células no-epiteliales (sobre todo mesenquimales). Componente del citoesqueleto. Se une a núcleo, retículo endoplásmico y mitocondria, lateral o terminalmente. Regula forma celular, integridad citoplasma y estabiliza interacciones del citoesqueleto. Implicada en respuesta inmune y en el transporte de colesterol-LDL desde el lisosoma hasta el lugar de esterificación. Organizadora de proteínas críticas para la adhesión, migración y señalización.								
		Aumenta en fibroblastos LC5 co-cultivados con Capan-1 respecto a cultivo con secretoma de Capan-1							
XRCC 6 (X Ray Repair cross-complementing protein 6) (149, 175)	Helicasa de DNA de cadena sencilla, dependiente de ATP. Tiene un papel en la traslocación cromosómica. Implicada en la reparación por unión terminal no homóloga, requerida para la reparación de daño de doble cadena. Puede actuar como regulador negativo de la transcripción.								

A la hora de estudiar las proteínas relacionadas con el metabolismo energético, presupusimos que nuestros modelos podrían mostrar modificaciones en la línea del efecto Warburg (27). Varios investigadores han descrito que esto sucede en tumores en distintos estadios y han podido correlacionarlo con peor pronóstico (30, 97, 176, 177). Además se ha descrito que la transición epitelio-mesenquimal debe requerir una modificación del metabolismo energético que permita obtener sustratos para el anabolismo celular (21).

El estudio de array de proteínas relacionadas con el metabolismo energético se realizó a través de una colaboración con expertos en el tema (Dr JM Cuezva y cols). Este grupo ha definido índices bioenergéticos para cuantificar los cambios que ocurren en cáncer. Con técnicas cuantitativas de proteómica destacan el *ratio* (β -F1-ATPase/GAPDH), una relación entre la subunidad catalítica de la proteína que genera ATP en la mitocondria como consecuencia de la fosforilación oxidativa y la proteína que cataliza el primer paso de la glicólisis (30, 176, 178). Un análisis de la Tabla 26 muestra que ninguna de estas dos proteínas varían sustancialmente en ninguna de las comparaciones realizadas, por lo que el índice bioenergético tampoco lo haría. La excepción está en los fibroblastos cultivados con medio condicionado de secretoma de PL45, en los que observamos una disminución de expresión de la ATPasa F1 analizada por DIGE, pero no cuando lo estudiamos por *protein array*.

Desde el punto de vista bioenergético destaca una mayor abundancia relativa de varias proteínas de la fosforilación oxidativa, en la línea Capan-1. Capan 1 y sus fibroblastos comparten un incremento en SDHb y una disminución de la PKM2. La línea PL45 sufre menos variación que la Capan-1, aunque destaca un aumento de HADHA, proteína mitocondrial responsable de la β -oxidación de los ácidos grasos. Los fibroblastos cultivados en presencia de PL45 disminuyen su expresión de PKM2 y LDHA. Esta variación en PKM2 suponen una disminución de la conversión del

piruvato al lactato, lo cual va en contra de que en este modelo las células transiten a un fenotipo "glicolítico". No obstante, esta alteración está descrita en células tumorales proliferantes (179).

Un hallazgo recurrente es el incremento de la expresión de HSP60 en las dos líneas tumorales. Esta proteína está implicada en la importación de proteínas mitocondriales y en el ensamblaje de macromoléculas. Puede facilitar un plegamiento correcto y prevenir o reparar plegamientos incorrectos en condiciones de estrés.

Desde un punto de vista terapéutico merecería la pena investigar el papel de anexina A2 y de HSP 60 como dianas de este proceso de interacción precoz epitelio-mesenquimal.

Un grupo de investigadores demostró que el silenciamiento de Anexina A2 suprimió la capacidad migratoria de las células tumorales en un modelo de carcinoma nasofaríngeo (180). Otro grupo utilizó anticuerpos anti-Anexina A2 y mostro su eficacia antineoplásica en modelos preclínicos de cáncer de ovario (181).

Con respecto a HSP60, aunque es una proteína mitocondrial, se sabe que en las células tumorales se ha detectado en citoplasma, membrana plasmática, aparato de Golgi y exosomas (182). No se conocen muy bien las funciones extra-mitocondriales de esta proteína, ni su papel en la comunicación intercelular. Algunos autores postulan que es una molécula que debe ser explorada como diana farmacológica (142).

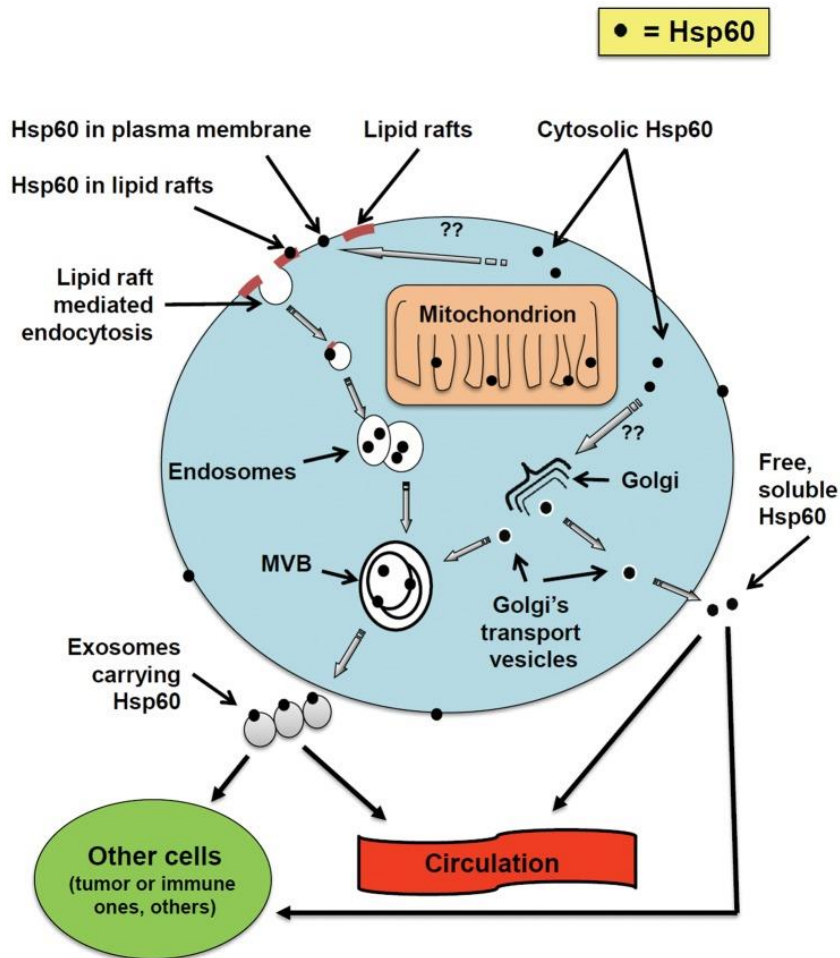


FIGURA 66. TRÁFICO DE HSP60 EN LA CÉLULA TUMORAL (182).

Tomado de: Campanella C, et al. PLoS One. 2012;7(7):e42008.

Es previsible que el bloqueo de estas proteínas no sea fácil desde el punto de vista de los eventos adversos potencialmente esperables en clínica. En el caso de la Anexina A2, su modulación podría tener consecuencias inflamatorias o trombóticas. En el caso de la HSP60, se podría inducir una disfunción mitocondrial. Posiblemente la dosis estaría limitada por los efectos extra-tumorales. Además, es probable que los intentos de modulación farmacológica en tumores avanzados no permitan demostrar actividad antitumoral relevante, dado que cuando la enfermedad está desarrollada son múltiples los mecanismos que

procuran la supervivencia y la resistencia del tumor ante agresiones del huésped o terapéuticas.

Pero pensamos que estas proteínas donde pueden tener un papel crítico es en el desarrollo inicial de la interacción entre el tumor y el estroma. En esta fase, su modulación farmacológica podría requerir menores dosis de agentes. Por ello deberían idearse metodologías y criterios para desarrollar moléculas en fases más precoces de la enfermedad, sin tener necesariamente que demostrar actividad en enfermedad diseminada. Por otra parte pensamos que probablemente es el contexto post-quirúrgico precoz la situación en donde el modelo desarrollado en este trabajo genera información más aplicable.

Este trabajo también genera evidencias de que el fibroblasto activado por tumor también incrementa la expresión de proteínas potencialmente interesantes desde el punto de vista terapéutico. Entre ellas están las tubulinas. Quizás sea esta otra explicación que contribuya a explicar la actividad del nab-paclitaxel en cáncer de páncreas.

TABLA 26. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON METABOLISMO ENERGÉTICO (DIGE +ARRAY DE PROTEÍNAS): LISTADO Y DESCRIPCIÓN FUNCIONAL.

Cambios diferenciales detectados en las proteínas del metabolismo energético tanto por DIGE como por array de las proteínas pre-seleccionadas. La cabecera de la tabla define los modelos de cultivo y el cultivo de referencia de la siguiente manera:

- Capan-1 ó PL45 + LC5, o viceversa (LC5 + Capan-1 ó PL45): co-cultivos directos. La referencia son los mono-cultivos de Capan-1 o PL 45, respectivamente (o LC5, en la situación inversa)
- LC5 + Capan-1 ó PL45: co-cultivos directos. La referencia son los mono-cultivos de LC5.
- Capan-1 ó PL45 / (LC5): cultivos de células epiteliales tumorales con medio condicionado (secretoma) de LC5 o con LC5, pero en cámaras Transwell. La referencia son los mono-cultivos de Capan-1 o PL45, respectivamente
- LC5 / (Capan-1 ó PL45): cultivos de fibroblastos con medio condicionado (secretoma) de células tumorales, o co-cultivos en cámaras Transwell. La referencia son los mono-cultivos de fibroblastos LC5.

Las celdas en negro indican que el experimento no se ha realizado en esa condición. Esto sucede en las filas que describen resultados de proteínas de metabolismo energético, no hubo co-cultivo directo (que permitiese contacto físico entre las dos líneas celulares), puesto que se realizaron en cámaras Transwell, como se ha expuesto previamente.

Proteína	Descripción	CELULAS TUMORALES				FIBROBLASTOS			
		<u>Capan-1</u> + <u>LC5</u>	<u>Capan-1</u> (<u>LC5</u>)	<u>PL45</u> + <u>LC5</u>	<u>PL-45</u> (<u>LC5</u>)	<u>LC5</u> + <u>Capan-1</u>	<u>LC5</u> (<u>Capan-1</u>)	<u>LC5</u> + <u>PL45</u>	<u>LC5</u> (<u>PL45</u>)
Peróxido reductasa mitocondrial dependiente de tioredoxina (152)	Regulador redox. Protegé enzimas sensibles a ROS. Regula la activación citosólica de NF-kappa-β.								

Proteína	Descripción	CELULAS TUMORALES				FIBROBLASTOS			
		Capan-1 + LC5	Capan-1 (LC5)	PL45 + LC5	PL-45 (LC5)	LC5 + Capan-1	LC5 (Capan-1)	LC5 + PL45	LC5 (PL45)
Piruvato Kinasa PKM (por DIGE)	Enzima glicolítico. Genera ATP por transferencia de un fosforilo de fosfoenolpiruvato al ADP. Estimula activación transcripcional. Participa en muerte celular independiente de caspasas. El ratio entre la forma tetramérica activa y el dímero hipoactivo determina el destino de los carbonos de la glucosa e la proliferación y supervivencia de la célula.								
PK-M2- Piruvato kinasa (protein array) (154-158)									
GAPDH (gliceraldehído 3-Fosfato deshidrogenasa) (protein array)	Cataliza el primer paso de la glicolisis. Tiene actividad cisteína nitrosilasa sobre proteínas nucleares (p.e. SIRT1, HDAC2) por lo que participa en transcripción, transporte RNA, replicación DNA y apoptosis. Modula organización y ensamblaje de citoesqueleto. Componente del complejo GAIT (inhibidor de la traducción activado por interferón γ).								
LDHA-Lactato deshidrogenasa A (protein array) (183)	Implicada en la vía que sintetiza lactato desde piruvato.								
NDUFS3 - NADH dehidrogenasa [ubiquinona] hierro-sulfuro proteína 3 mitocondrial (protein array), (184)	Subunidad fundamental del Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (NADH deshidrogenasa), implicado en la transferencia de electrones desde NADH a la cadena respiratoria.								

Proteína	Descripción	CELULAS TUMORALES				FIBROBLASTOS			
		Capan-1 + LC5	Capan-1 (LC5)	PL45 + LC5	PL-45 (LC5)	LC5- + Capan-1	LC5 (Capan-1)	LC5- + PL45	LC5 (PL45)
SDHB - Succinato dehidrogenasa [ubiquinona] hierro-sulfuro, subunidad B, mitocondrial (protein array) (185)	Subunidad Fe-sulfuro, implicada en el complejo II de la cadena mitocondrial. Transfiere electrones desde succinato a ubiquinona (coenzyma Q).								
CORE-2 – Complejo citocromo b-c1 subunidad 2, mitocondrial (protein array) (186, 187)	Componente crítico del complejo III mitocondrial, citocromo b-c1 (ubiquinol-citocromo c reductasa).								
COXII – Citocromo c oxidasa II, mitocondrial (protein array) (188)	Componente de la cadena respiratoria mitocondrial que cataliza la reducción de oxígeno a agua.								
β-F1 – ATP sintetasa mitocondrial, subunidad F1-β (protein array) (123-125)	ATP sintetasa de membrana mitocondrial (Complex V). Genera ATP en presencia de gradiente transmembrana de protones.								
ATP sintasa mitocondrial									

Proteína	Descripción	CELULAS TUMORALES				FIBROBLASTOS			
		Capan-1 + LC5	Capan-1 (LC5)	PL45 + LC5	PL-45 (LC5)	LC5 + Capan-1	LC5 (Capan-1)	LC5 + PL45	LC5 (PL45)
(DIGE)									
IF1 – Inhibidor mitocondrial de ATPase F1-β (protein array) (178, 189, 190)	Inhibe ATP sintetasa cuando la caída del potencial de membrana mitocondrial convierte la F1-ATPasa en una ATP hidrolasa para extruir protones fuera de la mitocondria. La inhibición de esta actividad ahorra ATP.								
SOD2 - Superóxido dismutasa [Mn], mitocondrial (protein array) (191, 192)	Destruye radicales superóxido producidos por la actividad celular, tóxicos para los sistemas biológicos.								
Catalasa (protein array) (193, 194)	Expresada en organismos aeróbicos para protegerlas del peróxido de hidrógeno. Promueve crecimiento de células T y B, de células mieloides leucémicas, melanoma, mastocitoma y fibroblastos normales y transformados.								
PDHe Piruvato dehidrogenasa componente E1, subunidad α, mitocondrial (Protein array), (195-197)	El complejo piruvato deshidrogenasa cataliza la conversión global de piruvato a acetil CoA y CO ₂ , por lo que enlaza la glicolisis con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos.								
HADHA – Enzima	Implicada en la β -oxidación de los ácidos grasos y metabolismo lipidico.								

Proteína	Descripción	CELULAS TUMORALES				FIBROBLASTOS			
		Capan-1 + LC5	Capan-1 (LC5)	PL45 + LC5	PL-45 (LC5)	LC5 + Capan-1	LC5 (Capan-1)	LC5 + PL45	LC5 (PL45)
trifuncional, subunidad α mitocondrial (Protein array) (198)									
HSP60 – Proteína de estrés térmico 60 kDa, mitocondrial (Protein array) (107, 113, 142-145)	Implicada en la importación de proteínas mitocondriales y el ensambraje de macromoléculas. Puede facilitar su plegamiento correcto. Puede prevenir o reparar plegamientos o ensamblajes incorrectos realizados en la matriz mitocondrial en circunstancias de estrés.								
HSP60, mitocondrial (DIGE)									
G6PDH: Glucosa 6 Fosfato deshidrogenasa (protein array) (136)	Cataliza la etapa limitante de la vía oxidativa de las pentosas fosfato. Proporciona reductores (NADPH) y pentosas fosfato para la síntesis de ácidos grasos y de ácidos nucleicos.								
Glucosa 6 Fosfato deshidrogenasa (DIGE)									



Conclusiones.

9. CONCLUSIONES.

1.- El co-cultivo de células tumorales de cáncer de páncreas con fibroblastos humanos es viable y representa un modelo experimental eficiente para generar hipótesis biológicas innovadoras.

2.- El modelo de co-cultivos con células de cáncer de páncreas humano y fibroblastos induce un incremento precoz de la capacidad de migración de tanto las células tumorales como de los fibroblastos. Esto se asocia, con la adquisición de rasgos moleculares de EMT en las células tumorales y de activación de fibroblastos a miofibroblastos.

3.- Los proteomas de las células tumorales y de los fibroblastos cambian con el co-cultivo:

- En la línea Capan-1, el análisis KEGG indica que las proteínas que disminuyen participan en uniones entre células epiteliales, mientras que se incrementan las relacionadas con migración e invasión, lo cual habla a favor de la adquisición de un fenotipo menos epitelial. Así mismo destaca el incremento de la proteína de estrés térmico HSP60, que sugiere la necesidad de mantener la funcionalidad de proteínas críticas sometidas a modificaciones secundarias al metabolismo celular.
- PL45, la línea sin mutación en SMAD, adquiere unos cambios muy diferentes. Algunos de los cambios son consecuencia de la activación de las proteínas SMADs, lo cual sugiere una transmisión de señales inducida por TGF- β . Otros reflejan una adaptación de la célula para el anabolismo proteico, mantenerlas funcionales, o eliminarlas/extruir las. También destaca que la célula se adapte a una situación de daño de DNA y que precise un incremento de proteínas relacionadas con el metabolismo monocarbonado. Esto último puede estar implicado en la disponibilidad de grupos metilo tanto para la síntesis de nucleótidos, como la de aminoácidos, como para la regulación epigenética de la expresión génica. Algunos cambios apoyan la transición a un fenotipo migratorio.

Dado el aumento de proteínas relacionadas con el tráfico de moléculas mediado por retículo endoplasmático, es posible que esta célula incremente la producción de exosomas, que podrían comportarse como elementos de “comunicación” intercelular con los fibroblastos.

- De forma global, los fibroblastos incrementan la cantidad de tubulinas y de anexinas, que están implicadas en varios procesos como el de la endocitosis de fagosomas o el establecimiento de uniones gap. Uno y otro pueden ser mecanismos por los cuales se facilita la entrada de moléculas del medio intercelular que contengan moléculas liberadas por las células epiteliales.

4.- Desde el punto de vista bioenergético destaca una mayor abundancia relativa de varias proteínas de la fosforilación oxidativa, en la línea Capan-1. La línea PL45 sufre menos variación que la Capan-1, aunque destaca un aumento de HADHA, proteína mitocondrial responsable de la β -oxidación de los ácidos grasos. Los fibroblastos cultivados en presencia de PL45 disminuyen su expresión de PKM2 y LDHA. Esta variación en PKM2 suponen una disminución de la conversión del piruvato al lactato, lo cual va en contra de que en este modelo las células transiten a un fenotipo “glicolítico”.

5.- Desde un punto de vista terapéutico nuestro trabajo destaca el papel de anexina A2 y de HSP 60 en estas interacciones epitelio-mesenquimales. Estas proteínas han sido destacadas muy recientemente por otros investigadores en otro modelo in vitro de cáncer de páncreas. Por ello concluimos que debería explorarse el potencial de estas dos proteínas como dianas terapéuticas.



Publicaciones.

10. PUBLICACIONES (199).

Abstract 1539: Analysis of differential protein profiles in co-culture mo... http://cancerres.aacrjournals.org/content/75/15_Supplement/1539?cited...

Cancer Research
cancerres.aacrjournals.org

doi: 10.1158/1538-7445.AM2015-1539
Cancer Res August 1, 2015 75; 1539

Abstract 1539: Analysis of differential protein profiles in co-culture models of pancreatic cancer cells and fibroblasts

Elena Prieto-García¹, M. Teresa Agulló-Ortuño¹, C. Vanesa Díaz-García¹, Inés García-Consuegra², Jorge Adeva³, M. Carmen Riesco³, Lucía Parrilla³, Carlos Gómez³, Laura Lema³, Luis Robles³, Hernán Cortés-Funes⁴, and José A. López-Martín⁴

☐ Author Affiliations

¹Laboratorio de Farmacología Molecular del Cáncer. Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain;

²Unidad de Proteómica. Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain;

³Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain;

⁴Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre. Servicio de Oncología Médica Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain.

Proceedings: AACR 106th Annual Meeting 2015; April 18-22, 2015; Philadelphia, PA

Abstract

Background: Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) remains one of the most lethal human malignancies. The vast majority of patients with advanced disease die within a year of diagnosis.

Tumor microenvironment plays a critical role in tumor initiation, progression, metastasis, and response to treatment in PDAC. Pancreatic adenocarcinoma cells often appear to grow within a fibrotic, abundant, and poorly perfused stroma, with epithelial cells frequently accounting for <20% of the tumor volume. Cellular components of tumor stroma include fibroblasts, macrophages, and stellate cells plus extracellular proteins. Moreover, the network of tumor stroma imposes a barrier for drug delivery.

The aim of this study was to search for novel protein biomarkers of tumor-stroma interaction for a better understanding and intervention of PDAC.

Methods: 1- Co-cultures between two pancreatic adenocarcinoma cell lines (PL45 and Capan-1) and embryonic fibroblasts (LC5) were established. LC5 cell line was stably transfected with Green Fluorescent Protein (GFP) to allow their detection, and later separation by flow cytometry, of the co-cultures. 2- In addition, tumor cells were grown with fibroblasts secretome. 3- After 72 hours of co-culture, tumor cells were isolated and protein extraction was performed. 4- Proteins differentially expressed in tumor cells grown in co-cultures, or in tumor cells grown with fibroblasts secretome, versus in tumor cells monocultures, were identified by using two-dimensional electrophoresis-based proteomic tools (2D-DIGE) followed by mass spectrometry (MS/MS) of the spots of interest.

Results: A total of 105 differentially expressed proteins were documented between PL45 cells growing in mono-culture, co-culture and conditioned medium. Also, 161 differentially expressed proteins were recognized under similar conditions in the Capan1 cell line.

Our study identified seventeen different proteins mainly involved in cytoskeleton organization (Filamin B, Alpha-actinin-4, Annexin A2, Radixin, T-complex protein 1 subunit epsilon, Actin cytoplasmic 1); regulation of cell migration and adhesion (Prelamin-A/C, 40S ribosomal protein SA); protein biosynthesis (EF-2); DNA damage and repair response (VCP, XRCC6); nucleotide biosynthetic process (MTHFD1) and, heat-stress response (HSPD1, GRP78, STIP1, CCT5, Stress-70 protein mitochondrial).

Conclusion: This in vitro model identifies several processes that might be responsible for the tumor-stromal interactions occurring in vivo, which should be considered potential targets for therapeutic interventions in PDAC, in addition to those targets already known to exist in PDAC cells.

Citation Format: Elena Prieto-García, M. Teresa Agulló-Ortuño, C. Vanesa Díaz-García, Inés García-Consuegra, Jorge Adeva, M. Carmen Riesco, Lucía Parrilla, Carlos Gómez, Laura Lema, Luis Robles, Hernán Cortés-Funes, José A. López-Martín. Analysis of differential protein profiles in co-culture models of pancreatic cancer cells and fibroblasts. [abstract]. In: Proceedings of the 106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2015 Apr 18-22; Philadelphia, PA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2015;75(15 Suppl):Abstract nr 1539. doi:10.1158/1538-7445.AM2015-1539

©2015 American Association for Cancer Research.



Abstract Nº 1539

Analysis of differential protein profiles in co-culture models of pancreatic cells and fibroblasts

E Prieto-García¹, MT Aguiló-Ortuño¹, CV Díaz-García¹, I García-Consuegra², J Adeva³, MC Riesco³, L Parrilla³, C Gómez³, L Lema³, L Robles³, H Cortés-Funes^{1,3}, JA López-Martín^{1,3}

¹Laboratorio de Farmacología Molecular del Cáncer, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12); ²Unidad de Proteómica (i+12); ³Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (Spain)



Background

- Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is one of the most lethal human malignancies. The vast majority of patients with advanced disease will die within a year of diagnosis.
- Tumor microenvironment plays a critical role in tumor initiation, progression, metastasis, and response to treatment in PDAC.
- Pancreatic adenocarcinoma cells often appear to grow within a fibrotic, abundant, and poorly perfused stroma, with epithelial components of tumor accounting for <20% of the tumor volume. Cellular components of tumor stroma include fibroblasts, macrophages, and stellate cells plus extracellular proteins. Moreover, the network of tumor stroma imposes a barrier for drug delivery.
- The aim of this study was to search for novel protein involved in tumor-stroma interactions for a better understanding and eventually, therapeutic intervention of PDAC.

Methodology

- Direct co-cultures between two PDAC cell lines (PL45 and Capan-1) and embryonic fibroblasts (LC6) were established (Figure 1). LC6s cell line was labeled with Green Fluorescent Protein (GFP) to allow separation from the co-cultures by Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) after 72h.
- Indirect co-cultures were established by growing tumor cells with fibroblasts conditioned media.
- Proteins differentially expressed in tumor cells grown in direct co-cultures (condition B), or in tumor cells grown with fibroblasts secretome (condition C), versus in tumor cells monocultures (condition A), were identified by using two-dimensional electrophoresis-based proteomic tools (2D-DIGE) followed by mass spectrometry (MS/MS) of the spots of interest.
- The identified proteins were analyzed by Gene Ontology (GO) to determine biological process.
- For the interaction analyses, we employed the following databases: Interactome, STRING, InrAct and Uniprot.

Acknowledgments

This research was supported by Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña (0600137), and Instituto de Salud Carlos III (FIS P11002072).

Results

- A total of 105 differentially expressed proteins were identified in PL45 cells growing in mono-culture (A), direct co-culture (B) and fibroblasts conditioned medium (C). For the Capan-1 cell line growing under similar conditions, 161 differentially expressed proteins were recognized.
- After enrichment analysis, our study identified 19 different proteins mainly involved in cytoskeleton organization; regulation of cell migration and adhesion; protein biosynthesis; DNA damage and repair response; nucleotide biosynthetic process and, heat stress response.
- There were 5 proteins increased in Capan-1 B versus A comparison, including ANXA2, RPSA, HSPB1, FLNB, and HSPD1. After hypergeometric and multi test adjustment, some of these proteins are significantly enriched in MAPK pathway, ANXA2 and HSPB1 are both also increased in Capan-1 C vs A analysis.
- There were 12 proteins increased in PL45 B vs A study: HSPD1, EF2, VCP, RDX, HSPA5, XRCR6, HSPA9, HSPA1A/1B, STIP1, CCT5 and MTHFD1. Signaling pathways involved are: Antigen processing and presentation, Protein processing in endoplasmic reticulum, Spliceosome and RNA degradation.

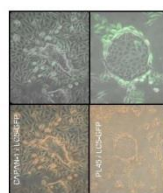


Figure 1. Co-cultures between PDAC cell lines (Capan-1 and PL45) and fibroblasts (LC6).

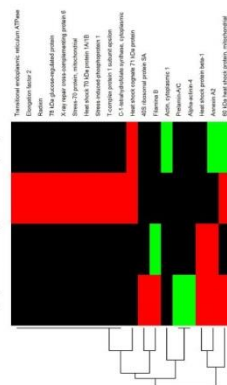


Figure 2. Hierarchy clustering across proteins to investigate the overall protein distribution pattern. Red: increased expression; Green: decreased expression; Black: no identification. Condition B: direct co-culture; Condition C: indirect co-culture.

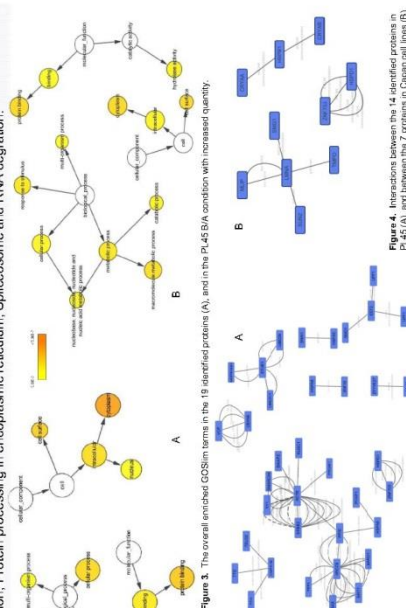


Figure 3. The overall enriched GO terms in the 19 identified proteins (A), and in the PL45 B/A condition with increased quantity (B).

Figure 4. Interactions between the 14 identified proteins in PL45 (A), and between the 7 proteins in Capan cell lines (B).

Conclusions

These *in vitro* models identify several processes that might be responsible for the tumor-stromal interactions occurring *in vivo*, which should be considered potential targets for therapeutic interventions in PDAC, in addition to those targets already known to exist in PDAC cells.



Bibliografía.

11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Suess HE, Urey HC. Abundances of the Elements. Reviews of Modern Physics. 1956;28(1):53-74.
2. Información li-UdSd. INSTITUTO DE INVESTIGACION HOSPITAL 12 DE OCTUBRE i+12 imas12 2015 [Available from: <http://imas12.es/>].
3. SEER. Cancer of the Pancreas - SEER Stat Fact Sheets 2015 [Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>].
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin. 2015;65(1):5-29.
5. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011;61(2):69-90.
6. Cabanes A, Vidal E, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, Lope V, et al. Cancer mortality trends in Spain: 1980–2007. Annals of Oncology. 2010;21(suppl 3):iii14-iii20.
7. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. Annu Rev Pathol. 2008;3:157-88.
8. Saiki Y, Horii A. Molecular pathology of pancreatic cancer. Pathol Int. 2014;64(1):10-9.
9. Hidalgo M. New insights into pancreatic cancer biology. Annals of Oncology. 2012;23(suppl 10):x135-x8.
10. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. Science. 2008;321(5897):1801-6.
11. Mahadevan D, Von Hoff DD. Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. Mol Cancer Ther. 2007;6(4):1186-97.
12. Chu GC, Kimmelman AC, Hezel AF, DePinho RA. Stromal biology of pancreatic cancer. J Cell Biochem. 2007;101(4):887-907.
13. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.
14. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. Acta Anat (Basel). 1995;154(1):8-20.
15. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. Sci Signal. 2014;7(344):re8.
16. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(3):178-96.

17. Nawshad A, Lagamba D, Polad A, Hay ED. Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs*. 2005;179(1-2):11-23.
18. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420-8.
19. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
20. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol*. 1994;127(6 Pt 2):2021-36.
21. Li L, Li W. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacol Ther*. 2015;150:33-46.
22. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*. 2009;19(2):156-72.
23. Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med*. 2013;19(11):1438-49.
24. Kiesslich T, Pichler M, Neureiter D. Epigenetic control of epithelial-mesenchymal-transition in human cancer. *Mol Clin Oncol*. 2013. p. 3-11.
25. Lu C, Thompson CB. Metabolic regulation of epigenetics. *Cell Metab*. 2012;16(1):9-17.
26. Kaelin WG, Jr., McKnight SL. Influence of metabolism on epigenetics and disease. *Cell*. 2013;153(1):56-69.
27. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956;124(3215):269-70.
28. Upadhyay M, Samal J, Kandpal M, Singh OV, Vivekanandan P. The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacol Ther*. 2013;137(3):318-30.
29. Agathocleous M, Harris WA. Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol*. 2013;23(10):484-92.
30. Cuezva JM, Ortega AD, Willers I, Sanchez-Cenizo L, Aldea M, Sanchez-Arago M. The tumor suppressor function of mitochondria: translation into the clinics. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(12):1145-58.
31. Wong KK, Engelman JA, Cantley LC. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2010;20(1):87-90.
32. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 2005;7(1):77-85.

33. King A, Selak MA, Gottlieb E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene*. 2006;25(34):4675-82.
34. Wu CY, Tsai YP, Wu MZ, Teng SC, Wu KJ. Epigenetic reprogramming and post-transcriptional regulation during the epithelial-mesenchymal transition. *Trends Genet*. 2012;28(9):454-63.
35. Paulsson J, Micke P. Prognostic relevance of cancer-associated fibroblasts in human cancer. *Semin Cancer Biol*. 2014;25:61-8.
36. Togo S, Polanska UM, Horimoto Y, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a promising therapeutic target. *Cancers (Basel)*. 2013;5(1):149-69.
37. Madar S, Goldstein I, Rotter V. 'Cancer associated fibroblasts'--more than meets the eye. *Trends Mol Med*. 2013;19(8):447-53.
38. Han Y, Zhang Y, Jia T, Sun Y. Molecular mechanism underlying the tumor-promoting functions of carcinoma-associated fibroblasts. *Tumour Biol*. 2015;36(3):1385-94.
39. Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Brilloff S, et al. Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *Am J Pathol*. 2007;171(5):1608-18.
40. Alspach E, Fu Y, Stewart SA. Senescence and the pro-tumorigenic stroma. *Crit Rev Oncog*. 2013;18(6):549-58.
41. Peng Y, Li Z, Yang P, Newton IP, Ren H, Zhang L, et al. Direct contacts with colon cancer cells regulate the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into tumor associated fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;451(1):68-73.
42. Lawrenson K, Grun B, Lee N, Mhawech-Fauceglia P, Kan J, Swenson S, et al. NPPB is a novel candidate biomarker expressed by cancer-associated fibroblasts in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2015;136(6):1390-401.
43. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res*. 2007;67(21):10123-8.
44. Bochet L, Lehoude C, Dauvillier S, Wang YY, Dirat B, Laurent V, et al. Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res*. 2013;73(18):5657-68.
45. Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rank F, Niebuhr E, et al. Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am J Pathol*. 2003;162(2):391-402.
46. Kramann R, DiRocco DP, Humphreys BD. Understanding the origin, activation and regulation of matrix-producing myofibroblasts for treatment of fibrotic disease. *J Pathol*. 2013;231(3):273-89.

47. Ren S, Duffield JS. Pericytes in kidney fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013;22(4):471-80.
48. Winter JM, Brody JR, Abrams RA, Lewis NL, Yeo CT. DeVita, Hellman, Rosenberg's Cancer Principles & Practice of Oncology. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2015.
49. Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, et al. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas*. 2004;29(3):179-87.
50. Xu Z, Pothula SP, Wilson JS, Apte MV. Pancreatic cancer and its stroma: a conspiracy theory. *World J Gastroenterol*. 2014;20(32):11216-29.
51. Apte MV, Wilson JS, Lugea A, Pandol SJ. A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment. *Gastroenterology*. 2013;144(6):1210-9.
52. Comoglio PM, Trusolino L. Cancer: the matrix is now in control. *Nat Med*. 11. United States 2005. p. 1156-9.
53. Riopel MM, Li J, Liu S, Leask A, Wang R. beta1 integrin-extracellular matrix interactions are essential for maintaining exocrine pancreas architecture and function. *Lab Invest*. 2013;93(1):31-40.
54. Maier HJ, Wirth T, Beug H. Epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2010;2(4):2058-83.
55. Whittle MC, Hingorani SR. Disconnect between EMT and metastasis in pancreas cancer. *Oncotarget*. 2015.
56. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. 2014;158(5):1110-22.
57. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*. 2013;339(6119):580-4.
58. Proteómica - Medicina molecular 2015 [Available from: <http://medmol.es/glosario/75/>].
59. Capan-1 ATCC® HTB-79™ Homo sapiens pancreas; derived from m 2015 [Available from: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-79.aspx?geo_country=es].
60. Li J, Wientjes MG, Au JL. Pancreatic cancer: pathobiology, treatment options, and drug delivery. *AAPS J*. 2010;12(2):223-32.
61. Berrozpe G, Schaeffer J, Peinado MA, Real FX, Perucho M. Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 1994;58(2):185-91.
62. Kita K, Saito S, Morioka CY, Watanabe A. Growth inhibition of human pancreatic cancer cell lines by anti-sense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes. *Int J Cancer*. 1999;80(4):553-8.

63. Butz J, Wickstrom E, Edwards J. Characterization of mutations and loss of heterozygosity of p53 and K-ras2 in pancreatic cancer cell lines by immobilized polymerase chain reaction. *BMC Biotechnology*. 2003;3:11-.
64. Schutte M, Hruban RH, Hedrick L, Cho KR, Nadasdy GM, Weinstein CL, et al. DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res*. 1996;56(11):2527-30.
65. Deer EL, Gonzalez-Hernandez J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, et al. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*. 2010;39(4):425-35.
66. Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet*. 1994;8(1):27-32.
67. Huang L, Goodrow TL, Zhang SY, Klein-Szanto AJ, Chang H, Ruggeri BA. Deletion and mutation analyses of the P16/MTS-1 tumor suppressor gene in human ductal pancreatic cancer reveals a higher frequency of abnormalities in tumor-derived cell lines than in primary ductal adenocarcinomas. *Cancer Res*. 1996;56(5):1137-41.
68. PL45 ATCC ® CRL-2558™ Homo sapiens pancreas ductal adenocarcinoma 2015 [Available from: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2558.aspx#documentation>].
69. Dempe S, Stroh-Dege AY, Schwarz E, Rommelaere J, Dinsart C. SMAD4: a predictive marker of PDAC cell permissiveness for oncolytic infection with parvovirus H-1PV. *Int J Cancer*. 2010;126(12):2914-27.
70. Jaffee EM, Schutte M, Gossett J, Morsberger LA, Adler AJ, Thomas M, et al. Development and characterization of a cytokine-secreting pancreatic adenocarcinoma vaccine from primary tumors for use in clinical trials. *Cancer J Sci Am*. 1998;4(3):194-203.
71. Su GH, Bansal R, Murphy KM, Montgomery E, Yeo CJ, Hruban RH, et al. ACVR1B (ALK4, activin receptor type 1B) gene mutations in pancreatic carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(6):3254-7.
72. Mellert W, Kleinschmidt A, Schmidt J, Festl H, Emler S, Roth WK, et al. Infection of human fibroblasts and osteoblast-like cells with HIV-1. *Aids*. 1990;4(6):527-35.
73. Erfle V, Mellert W, inventors; GSF GES FÜR STRAHLEN UND UMWEL, assignee. Human cell line LC5 and its use 1991 1991/11/13/Application date.
74. 293T ATCC ® CRL-3216™ Homo sapiens embryonic kidney 2015 [Available from: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-3216.aspx?geo_country=es].
75. MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit 2015 [Available from: <http://www.lonza.com/products-services/bio-research/cell-culture->

- products/mycoplasma-detection-and-removal/mycoalert-mycoplasma-detection-kit.aspx.
76. Microsoft PowerPoint - 2015 SS Methods in Cell Biology - MethodsCellBiology2.pdf 2015 [Available from: <http://www.meduniwien.ac.at/user/johannes.schmid/MethodsCellBiology2.pdf>].
 77. Goers L, Freemont P, Polizzi KM. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J R Soc Interface*. 2014;11(96).
 78. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV. In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp*. 2014(88).
 79. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007;2(2):329-33.
 80. Ye D, Dawson KA, Lynch I. A TEM protocol for quality assurance of in vitro cellular barrier models and its application to the assessment of nanoparticle transport mechanisms across barriers. *Analyst*. 2015;140(1):83-97.
 81. Gorg A, Postel W, Gunther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 1988;9(9):531-46.
 82. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*. 1996;68(5):850-8.
 83. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999;20(18):3551-67.
 84. Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, et al. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(Database issue):D115-9.
 85. R: "Finding Groups in Data": Cluster Analysis Extended Rousseeuw et al. 2015 [Available from: <https://stat.ethz.ch/R-manual/R-patched/library/cluster/html/00Index.html>].
 86. R: Hierarchical Clustering 2015 [Available from: <https://stat.ethz.ch/R-manual/R-patched/library/stats/html/hclust.html>].
 87. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes 2015 [Available from: <http://www.genome.jp/kegg/>].
 88. Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(Database issue):D52-7.
 89. Kanehisa M. The KEGG database. *Novartis Found Symp*. 2002;247:91-101; discussion -3, 19-28, 244-52.

90. Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Web Server issue):W741-8.
91. Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Web Server issue):W77-83.
92. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res.* 2001;125(1-2):279-84.
93. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D1049-56.
94. Camon E, Barrell D, Lee V, Dimmer E, Apweiler R. The Gene Ontology Annotation (GOA) Database--an integrated resource of GO annotations to the UniProt Knowledgebase. *In Silico Biol.* 2004;4(1):5-6.
95. Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics.* 2005;21(16):3448-9.
96. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-504.
97. Acebo P, Giner D, Calvo P, Blanco-Rivero A, Ortega ÁD, Fernández PL, et al. Cancer Abolishes the Tissue Type-Specific Differences in the Phenotype of Energetic Metabolism. *Translational Oncology.* 2009;2(3):138-45.
98. Santacatterina F, Chamorro M, de Arenas CN, Navarro C, Martin MA, Cuezva JM, et al. Quantitative analysis of proteins of metabolism by reverse phase protein microarrays identifies potential biomarkers of rare neuromuscular diseases. *J Transl Med.* 2015;13:65.
99. Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res.* 2011;1(4):482-97.
100. Tanaka K, Miyata H, Sugimura K, Fukuda S, Kanemura T, Yamashita K, et al. miR-27 is associated with chemoresistance in esophageal cancer through transformation of normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts. *Carcinogenesis.* 2015;36(8):894-903.
101. Tommelein J, Verset L, Boterberg T, Demetter P, Bracke M, De Wever O. Cancer-associated fibroblasts connect metastasis-promoting communication in colorectal cancer. *Front Oncol.* 2015;5:63.
102. Zhang L, Zhang J, Xu C, Zhou X, Wang W, Zheng R, et al. Lefty-1 alleviates TGF-beta1-induced fibroblast-myofibroblast

- transdifferentiation in NRK-49F cells. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:4669-78.
103. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2015;4(3):215-66.
 104. Lin J, Liu C, Ge L, Gao Q, He X, Liu Y, et al. Carcinoma-associated fibroblasts promotes the proliferation of a lingual carcinoma cell line by secreting keratinocyte growth factor. *Tumour Biol.* 2011;32(3):597-602.
 105. Pickard A, Cichon AC, Barry A, Kieran D, Patel D, Hamilton P, et al. Inactivation of Rb in stromal fibroblasts promotes epithelial cell invasion. *Embo j.* 2012;31(14):3092-103.
 106. Sato N, Maehara N, Goggins M. Gene Expression Profiling of Tumor-Stromal Interactions between Pancreatic Cancer Cells and Stromal Fibroblasts. *Cancer Research.* 2004;64(19):6950-6.
 107. Baron B, Kitagawa T, Nakamura K, Kuramitsu Y. Isolation of a Growth Factor Stress-induced Pancreatic Cancer Sub-population: Insight into Changes Due to Micro-environment. *Cancer Genomics - Proteomics.* 2015;12(2):49-55.
 108. Baron B, Fujioka T, Kitagawa T, Maehara S-I, Maehara Y, Nakamura K, et al. Comparative Proteomic Analysis of Two Stress-management Strategies in Pancreatic Cancer. *Cancer Genomics - Proteomics.* 2015;12(2):83-7.
 109. Wang C-Y, Lin C-F, Wang C-Y, Lin C-F. Annexin A2: Its Molecular Regulation and Cellular Expression in Cancer Development. *Disease Markers.* 2014;2014:2014.
 110. Luo M, Hajjar KA. Annexin A2 system in human biology: cell surface and beyond. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39(4):338-46.
 111. Tsai CL, Tsai CN, Lin CY, Chen HW, Lee YS, Chao A, et al. Secreted stress-induced phosphoprotein 1 activates the ALK2-SMAD signaling pathways and promotes cell proliferation of ovarian cancer cells. *Cell Rep.* 2012;2(2):283-93.
 112. Zhang LH, Zhang X. Roles of GRP78 in physiology and cancer. *J Cell Biochem.* 2010;110(6):1299-305.
 113. Cappello F, Conway de Macario E, Marasa L, Zummo G, Macario AJ. Hsp60 expression, new locations, functions and perspectives for cancer diagnosis and therapy. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(6):801-9.
 114. Kotini M, Mayor R. Connexins in migration during development and cancer. *Dev Biol.* 2015;401(1):143-51.
 115. Roma-Rodrigues C, Fernandes AR, Baptista PV. Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells. *Biomed Res Int.* 2014;2014:179486.
 116. Lazarides E. Actin, alpha-actinin, and tropomyosin interaction in the structural organization of actin filaments in nonmuscle cells. 1976.

117. Knudsen KA, Soler AP, Johnson KR, Wheelock MJ. Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. 1995.
118. Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H, et al. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol.* 1998;140(6):1383-93.
119. Yan Q, Sun W, Kujala P, Lotfi Y, Vida TA, Bean AJ. CART: an Hrs/actinin-4/BEP/myosin V protein complex required for efficient receptor recycling. *Mol Biol Cell.* 2005;16(5):2470-82.
120. ACTG1 actin gamma 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI: Pubs; 2015 [Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>].
121. Takata Y, Yamada T, Huang Y, Komoto J, Gomi T, Ogawa H, et al. Catalytic mechanism of S-adenosylhomocysteine hydrolase. Site-directed mutagenesis of Asp-130, Lys-185, Asp-189, and Asn-190. *J Biol Chem.* 2002;277(25):22670-6.
122. D'Acunto CW, Gbelcova H, Festa M, Ruml T. The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation. *Cell Signal.* 2014;26(1):173-8.
123. ATP5A1 - ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human) 2015 [Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P25705>].
124. Hubbard MJ, McHugh NJ. Mitochondrial ATP synthase F1-beta-subunit is a calcium-binding protein. *FEBS Lett.* 1996;391(3):323-9.
125. Aldea M, Clofent J, Nunez de Arenas C, Chamorro M, Velasco M, Berrendero JR, et al. Reverse phase protein microarrays quantify and validate the bioenergetic signature as biomarker in colorectal cancer. *Cancer Lett.* 2011;311(2):210-8.
126. Gething MJ, Sambrook J. Transport and assembly processes in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Biol.* 1990;1(1):65-72.
127. MTHFD1 methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI: Pubs; 2015 [Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>].
128. HSPB1 - Heat shock protein beta-1 - Homo sapiens (Human) 2015 [Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P04792>].
129. FLNB - Filamin-B - Homo sapiens (Human) 2015 [Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/O75369>].
130. Bandaru S, Zhou AX, Rouhi P, Zhang Y, Bergo MO, Cao Y, et al. Targeting filamin B induces tumor growth and metastasis via enhanced activity of matrix metalloproteinase-9 and secretion of VEGF-A. *Oncogenesis.* 2014;3:e119.

131. De Franceschi N, Ivaska J. Integrin bondage: filamin takes control. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22(5):355-7.
132. Iguchi Y, Ishihara S, Uchida Y, Tajima K, Mizutani T, Kawabata K, et al. Filamin B Enhances the Invasiveness of Cancer Cells into 3D Collagen Matrices. *Cell Struct Funct.* 2015;40(2):61-7.
133. Liu J, Das M, Yang J, Ithychanda SS, Yakubenko VP, Plow EF, et al. Structural mechanism of integrin inactivation by filamin. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22(5):383-9.
134. Modarres HP, Mofradt MR. Filamin: a structural and functional biomolecule with important roles in cell biology, signaling and mechanics. *Mol Cell Biomech.* 2014;11(1):39-65.
135. Chao A, Lai CH, Tsai CL, Hsueh S, Hsueh C, Lin CY, et al. Tumor stress-induced phosphoprotein1 (STIP1) as a prognostic biomarker in ovarian cancer. *PLoS One.* 2013;8(2):e57084.
136. Wang YP, Zhou LS, Zhao YZ, Wang SW, Chen LL, Liu LX, et al. Regulation of G6PD acetylation by SIRT2 and KAT9 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress. *Embo j.* 2014;33(12):1304-20.
137. Liao Y, Tang L. The critical roles of HSC70 in physiological and pathological processes. *Curr Pharm Des.* 2014;20(1):101-7.
138. Liu T, Daniels CK, Cao S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* 2012;136(3):354-74.
139. Stricher F, Macri C, Ruff M, Muller S. HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting. *Autophagy.* 2013;9(12):1937-54.
140. Arrigo AP, Gibert B. HspB1, HspB5 and HspB4 in Human Cancers: Potent Oncogenic Role of Some of Their Client Proteins. *Cancers (Basel).* 2014;6(1):333-65.
141. Zhang S, Hu Y, Huang Y, Xu H, Wu G, Dai H. Heat shock protein 27 promotes cell proliferation through activator protein-1 in lung cancer. *Oncol Lett.* 2015;9(6):2572-6.
142. Cappello F, Marino Gammazza A, Palumbo Piccionello A, Campanella C, Pace A, Conway de Macario E, et al. Hsp60 chaperonopathies and chaperonotherapy: targets and agents. *Expert Opin Ther Targets.* 2014;18(2):185-208.
143. Khalil AA, Kabapy NF, Deraz SF, Smith C. Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim Biophys Acta.* 2011;1816(2):89-104.
144. Pellegrino MW, Nargund AM, Haynes CM. Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2013;1833(2):410-6.

145. HSPD1 - 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor - Homo sapiens (Human) 2015 [Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P10809>].
146. HSPA1A - Heat shock 70 kDa protein 1A - Homo sapiens (Human) 2015 [Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P0DMV8>].
147. Cooley J, Takayama TK, Shapiro SD, Schechter NM, Remold-O'Donnell E. The serpin MNEI inhibits elastase-like and chymotrypsin-like serine proteases through efficient reactions at two active sites. *Biochemistry*. 2001;40(51):15762-70.
148. Naryzhny SN. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(23):3789-808.
149. Iyama T, Wilson DM, 3rd. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*. 2013;12(8):620-36.
150. Wang SC. PCNA: a silent housekeeper or a potential therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci*. 2014;35(4):178-86.
151. Schiene-Fischer C. Multidomain Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerases. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1850(10):2005-16.
152. Masaki M, Ikeda A, Shiraki E, Oka S, Kawasaki T. Mixed lineage kinase LZK and antioxidant protein-1 activate NF-kappaB synergistically. *Eur J Biochem*. 2003;270(1):76-83.
153. Nystrom T, Yang J, Molin M. Peroxiredoxins, gerontogenes linking aging to genome instability and cancer. *Genes Dev*. 2012;26(18):2001-8.
154. Iqbal MA, Gupta V, Gopinath P, Mazurek S, Bamezai RN. Pyruvate kinase M2 and cancer: an updated assessment. *FEBS Lett*. 2014;588(16):2685-92.
155. Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O'Meally R, et al. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell*. 2011;145(5):732-44.
156. Luo W, Semenza GL. Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget*. 2011;2(7):551-6.
157. Yang W, Lu Z. Regulation and function of pyruvate kinase M2 in cancer. *Cancer Lett*. 2013;339(2):153-8.
158. Stetak A, Veress R, Ovadi J, Csermely P, Keri G, Ullrich A. Nuclear translocation of the tumor marker pyruvate kinase M2 induces programmed cell death. *Cancer Res*. 2007;67(4):1602-8.
159. LMNA - Prelamin-A/C precursor - Homo sapiens (Human) 2015 [Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P02545>].
160. Khan MM, Simizu S, Kawatani M, Osada H. The potential of protein disulfide isomerase as a therapeutic drug target. *Oncol Res*. 2011;19(10-11):445-53.

161. Xu S, Sankar S, Neamati N. Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2014;19(3):222-40.
162. Brackley KI, Grantham J. Activities of the chaperonin containing TCP-1 (CCT): implications for cell cycle progression and cytoskeletal organisation. *Cell Stress Chaperones*. 2009;14(1):23-31.
163. Ryu J, Kaul Z, Yoon AR, Liu Y, Yaguchi T, Na Y, et al. Identification and functional characterization of nuclear mortalin in human carcinogenesis. *J Biol Chem*. 2014;289(36):24832-44.
164. Gonzalez-Gronow M, Selim MA, Papalas J, Pizzo SV. GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(9):2299-306.
165. Gray PC, Vale W. Cripto/GRP78 modulation of the TGF-beta pathway in development and oncogenesis. *FEBS Lett*. 2012;586(14):1836-45.
166. Nakajima S, Kitamura M. Bidirectional regulation of NF-kappaB by reactive oxygen species: a role of unfolded protein response. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:162-74.
167. Rea VE, Rossi FW, De Paulis A, Ragno P, Selleri C, Montuori N. 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in cancer and infection. *Infez Med*. 2012;20 Suppl 2:8-12.
168. Ahvazi B, Boeshans KM, Idler W, Baxa U, Steinert PM. Roles of calcium ions in the activation and activity of the transglutaminase 3 enzyme. *J Biol Chem*. 2003;278(26):23834-41.
169. Ahvazi B, Boeshans KM, Rastinejad F. The emerging structural understanding of transglutaminase 3. *J Struct Biol*. 2004;147(2):200-7.
170. Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(2):140-56.
171. Jiang L, Phang JM, Yu J, Harrop SJ, Sokolova AV, Duff AP, et al. CLIC proteins, ezrin, radixin, moesin and the coupling of membranes to the actin cytoskeleton: a smoking gun? *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(2):643-57.
172. Burns RG, Surridge C. Analysis of beta-tubulin sequences reveals highly conserved, coordinated amino acid substitutions. Evidence that these 'hot spots' are directly involved in the conformational change required for dynamic instability. *FEBS Lett*. 1990;271(1-2):1-8.
173. VIM vimentin [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI: Pubs; 2015 [Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>].
174. Traub P. Intermediate filaments and gene regulation. *Physiol Chem Phys Med NMR*. 1995;27(4):377-400.
175. Tudek B. Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. *Mol Aspects Med*. 2007;28(3-4):258-75.
176. Sanchez-Arago M, Cuezva JM. The bioenergetic signature of isogenic colon cancer cells predicts the cell death response to

- treatment with 3-bromopyruvate, iodoacetate or 5-fluorouracil. *J Transl Med.* 2011;9:19.
177. Lopez-Rios F, Sanchez-Arago M, Garcia-Garcia E, Ortega AD, Berrendero JR, Pozo-Rodriguez F, et al. Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res.* 2007;67(19):9013-7.
 178. Sanchez-Arago M, Formentini L, Martinez-Reyes I, Garcia-Bermudez J, Santacatterina F, Sanchez-Cenizo L, et al. Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers. *Oncogenesis.* 2013;2:e46.
 179. Israelsen WJ, Dayton TL, Davidson SM, Fiske BP, Hosios AM, Bellinger G, et al. PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells. *Cell.* 2013;155(2):397-409.
 180. Chen CY, Lin YS, Chen CL, Chao PZ, Chiou JF, Kuo CC, et al. Targeting annexin A2 reduces tumorigenesis and therapeutic resistance of nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget.* 2015;6(29):26946-59.
 181. Lokman NA, Elder AS, Ween MP, Pyragius CE, Hoffmann P, Oehler MK, et al. Annexin A2 is regulated by ovarian cancer-peritoneal cell interactions and promotes metastasis. *Oncotarget.* 2013;4(8):1199-211.
 182. Campanella C, Bucchieri F, Merendino AM, Fucarino A, Burgio G, Corona DF, et al. The odyssey of Hsp60 from tumor cells to other destinations includes plasma membrane-associated stages and Golgi and exosomal protein-trafficking modalities. *PLoS One.* 2012;7(7):e42008.
 183. Miao P, Sheng S, Sun X, Liu J, Huang G. Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life.* 2013;65(11):904-10.
 184. He X, Zhou A, Lu H, Chen Y, Huang G, Yue X, et al. Suppression of mitochondrial complex I influences cell metastatic properties. *PLoS One.* 2013;8(4):e61677.
 185. Hoekstra AS, Bayley JP. The role of complex II in disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1827(5):543-51.
 186. Kamarajugadda S, Stemboroski L, Cai Q, Simpson NE, Nayak S, Tan M, et al. Glucose oxidation modulates anoikis and tumor metastasis. *Mol Cell Biol.* 2012;32(10):1893-907.
 187. Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett.* 2015;356(2 Pt A):156-64.
 188. Liou JY, Aleksic N, Chen SF, Han TJ, Shyue SK, Wu KK. Mitochondrial localization of cyclooxygenase-2 and calcium-independent

- phospholipase A2 in human cancer cells: implication in apoptosis resistance. *Exp Cell Res.* 2005;306(1):75-84.
189. Sanchez-Cenizo L, Formentini L, Aldea M, Ortega AD, Garcia-Huerta P, Sanchez-Arago M, et al. Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. *J Biol Chem.* 2010;285(33):25308-13.
 190. Sanchez-Arago M, Formentini L, Garcia-Bermudez J, Cuezva JM. IF1 reprograms energy metabolism and signals the oncogenic phenotype in cancer. *Cell Cycle.* 11. United States 2012. p. 2963-4.
 191. Cyr AR, Hitchler MJ, Domann FE. Regulation of SOD2 in cancer by histone modifications and CpG methylation: closing the loop between redox biology and epigenetics. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(15):1946-55.
 192. Hempel N, Carrico PM, Melendez JA. Manganese superoxide dismutase (Sod2) and redox-control of signaling events that drive metastasis. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011;11(2):191-201.
 193. Takeuchi A, Miyamoto T, Yamaji K, Masuho Y, Hayashi M, Hayashi H, et al. A human erythrocyte-derived growth-promoting factor with a wide target cell spectrum: identification as catalase. *Cancer Res.* 1995;55(7):1586-9.
 194. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med.* 2015;87:84-97.
 195. Desideri E, Vegliante R, Ciriolo MR. Mitochondrial dysfunctions in cancer: genetic defects and oncogenic signaling impinging on TCA cycle activity. *Cancer Lett.* 2015;356(2 Pt A):217-23.
 196. Zhang SL, Hu X, Zhang W, Yao H, Tam KY. Development of pyruvate dehydrogenase kinase inhibitors in medicinal chemistry with particular emphasis as anticancer agents. *Drug Discov Today.* 2015;20(9):1112-9.
 197. Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(14):2577-604.
 198. Yang SY, He XY, Schulz H. 3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and short chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in human health and disease. *Febs j.* 2005;272(19):4874-83.
 199. Prieto-García E, Agulló-Ortuño MT, Díaz-García CV, García-Consuegra I, Adeva J, Riesco MC, et al. Abstract 1539: Analysis of differential protein profiles in co-culture models of pancreatic cancer cells and fibroblasts. *Cancer Research.* 2015;75(15 Supplement):1539-.



Apéndice.

12. APÉNDICE

TABLA 1. RELACIÓN DE SPOTS PROTEICOS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN LA COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE CAPAN-1 CULTIVADA CON MEDIO CONDICIONADO DE FIBROBLASTOS LC5) VERSUS MONO-CULTIVOS (CAPAN-1) MEDIANTE DIGE (CAPANC_CY2 / CAPANA_CY5). 240	
TABLA 2. RELACIÓN DE SPOTS PROTEICOS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN LA COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE CO-CULTIVOS (CAPAN-1 + FIBROBLASTOS LC5) VERSUS MONO-CULTIVOS (CAPAN-1) MEDIANTE DIGE (CAPANB_CY3 / CAPANA_CY5)	241
TABLA 3. RELACIÓN DE SPOTS PROTEICOS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN LA COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE CO-CULTIVOS (CAPAN-1 + FIBROBLASTOS LC5) VERSUS CULTIVOS (CAPAN-1) EN MEDIO CONDICIONADO (LC5), MEDIANTE DIGE (CAPANB_CY3 / CAPANC_CY2).....	243
TABLA 4. RELACIÓN DE SPOTS PROTEICOS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN LA COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE CULTIVOS PL45 EN MEDIO CONDICIONADO LC5 VERSUS MONO-CULTIVOS (PL45) MEDIANTE DIGE (PL45 C_CY2 / PL45 A_CY5).....	246
TABLA 5. RELACIÓN DE SPOTS PROTEICOS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN LA COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE CO-CULTIVOS (PL45 + FIBROBLASTOS LC5) VERSUS MONO-CULTIVOS (PL45) MEDIANTE DIGE (PL45B_CY3 / PL45A_CY5)	247
TABLA 6. RELACIÓN DE SPOTS PROTEICOS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN LA COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE CO-CULTIVOS (PL45 + FIBROBLASTOS LC5) VERSUS CULTIVOS DE PL45 EN MEDIO CONDICIONADO LC5, MEDIANTE DIGE (PL45B_CY3 / PL45C_CY2).	248
TABLA 7. FIBROBLASTOS LC5 MONOCULTIVO VS CO-CULTIVO CON CAPAN-1.	250
TABLA 8. FIBROBLASTOS LC5 MONO-CULTIVO VS CULTIVO CON MEDIO CONDICIONADO DE CAPAN-1	251
TABLA 9. FIBROBLASTOS LC5 CO-CULTIVO CON CAPAN-1 VS CULTIVO EN MEDIO CONDICIONADO DE CAPAN-1	252
TABLA 10. FIBROBLASTOS LC5 MONO-CULTIVO VS CO-CULTIVO CON PL-45.....	253
TABLA 11. FIBROBLASTOS LC5: MONOCULTIVOS VS CULTIVO CON MEDIO CONDICIONADO DE PL45...	254
TABLA 12. FIBROBLASTOS LC5 CRECIDOS CON SECRETOMA DE PL45 VS CO-CULTIVADOS CON PL45..	255

TABLA 1. RELACIÓN DE SPOTS PROTEICOS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN LA COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE CAPAN-1 CULTIVADA CON MEDIO CONDICIONADO DE FIBROBLASTOS LC5) VERSUS MONO-CULTIVOS (CAPAN-1) MEDIANTE DIGE (CAPANC_CY2 / CAPANA_CY5).

Spot No.	Proteína.	Abundancia	Ratio
324		Disminuida	-2
336		Disminuida	-2.72
1317		Disminuida	-1.68
1339		Disminuida	-1.94
1400		Disminuida	-1.67
1401		Disminuida	-1.93
1413	Filamina B	Disminuida	-1.94
1804		Incrementada	2.37
1807		Incrementada	2.46
1813		Incrementada	2.25
1901		Incrementada	1.62
2202		Incrementada	1.62
2819		Disminuida	-1.78
2853	Anexina A2	Incrementada	1.71
2859		Disminuida	-1.95
4437		Disminuida	-1.62
4497		Disminuida	-2.02

TABLA 2. RELACIÓN DE SPOTS PROTEICOS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN LA COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE CO-CULTIVOS (CAPAN-1 + FIBROBLASTOS LC5) VERSUS MONO-CULTIVOS (CAPAN-1) MEDIANTE DIGE (CAPANB_CY3 / CAPANA_CY5)

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
336		Incrementada	2.57
573		Disminuida	-2.02
579		Disminuida	-2.08
602		Disminuida	-2.51
797		Disminuida	-2.42
836		Disminuida	-2.28
841		Disminuida	-2.21
846		Disminuida	-2.91
940		Disminuida	-2.12
972		Disminuida	-2.12
1059		Disminuida	-5.1
1084		Disminuida	-2.59
1116		Disminuida	-2.01
1142		Incrementada	8.36
1143		Incrementada	6.13
1144	Filamina B	Incrementada	6.06
1219		Incrementada	3.19
1222		Incrementada	2.17
1223	Filamina B	Incrementada	3.21
1228		Disminuida	-2.66
1248		Disminuida	-2.76
1299		Incrementada	3.58
1302	α-Actinina – 4	Disminuida	-3.22
1310		Disminuida	-2.14
1317		Incrementada	2.01
1321		Incrementada	2.84
1400		Incrementada	2.34
1401		Incrementada	2.82
1494		Disminuida	-2.81
1497		Disminuida	-3.25
1628		Incrementada	3.42
1640		Incrementada	2.16
1642	Prelamina A/C	Disminuida	-2.36
1683		Disminuida	-2.26
1736		Disminuida	-2.35
1871		Disminuida	-2
1976	Prelamina A/C	Disminuida	-4.74
2083		Disminuida	-2.07
2135		Disminuida	-2.62
2220		Disminuida	-2.08
2257		Incrementada	4.23
2267		Incrementada	3.66

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
2271		Incrementada	2.06
2278		Incrementada	5.1
2291	HSP60	Incrementada	11
2380		Incrementada	10.8
2431		Incrementada	5.12
2441		Incrementada	13.11
2477		Incrementada	3.79
2577		Incrementada	4.86
2588		Incrementada	2.73
2610		Incrementada	19.33
2634		Incrementada	5.49
2819		Incrementada	5.04
2858		Incrementada	2.99
2859		Incrementada	5.04
3096	Anexina A2	Incrementada	10.09
3103	Anexina A2	Incrementada	11.14
3409	40S proteína ribosomal SA	Incrementada	2.41
3589	HSP β-1	Disminuida	-2.35
3799		Incrementada	7.57
4365		Incrementada	5.2
4437		Incrementada	4.28

TABLA 3. RELACIÓN DE SPOTS PROTEICOS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN LA COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE CO-CULTIVOS (CAPAN-1 + FIBROBLASTOS LC5) VERSUS CULTIVOS (CAPAN-1) EN MEDIO CONDICIONADO (LC5), MEDIANTE DIGE (CAPANB_CY3 / CAPANC_CY2).

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
324		Incrementada	3.85
336		Incrementada	7.06
602		Disminuida	-2.71
764		Incrementada	2.55
806		Disminuida	-1.98
826		Disminuida	-2.04
836		Disminuida	-1.97
841		Disminuida	-2.37
842		Disminuida	-1.99
846		Disminuida	-2.08
940		Disminuida	-2.09
1059		Disminuida	-3.59
1083		Disminuida	-2.14
1142		Incrementada	8.2
1143		Incrementada	6.92
1144	Filamina B	Incrementada	7.79
1219		Incrementada	3.96
1223	Filamina B	Incrementada	3.48
1228		Disminuida	-1.98
1248		Disminuida	-2.23
1292		Incrementada	2.31
1299		Incrementada	4.75
1302	α -Actinina – 4	Disminuida	-3.64
1310		Disminuida	-2.01
1317		Incrementada	3.4
1321		Incrementada	4.42
1339		Incrementada	2.13
1399		Incrementada	2.26
1400		Incrementada	3.95
1401		Incrementada	5.51
1413	Filamina B	Incrementada	2.38
1494		Disminuida	-2.76
1497		Disminuida	-3.3
1582		Incrementada	2.29
1628		Incrementada	3.01
1640		Incrementada	2.36
1642	Prelamina A/C	Disminuida	-2.3
1683		Disminuida	-2.58
1694		Disminuida	-2.21
1736		Disminuida	-2.63

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
1804		Disminuida	-2.54
1807		Disminuida	-3.05
1813		Disminuida	-3.24
1834		Disminuida	-2.21
1836		Disminuida	-2.09
1871		Disminuida	-2.88
1976	Prelamina A/C	Disminuida	-3.4
2069		Disminuida	-2.34
2072		Disminuida	-2.27
2079		Disminuida	-2.24
2080		Disminuida	-2.49
2083		Disminuida	-2.51
2084		Incrementada	2.26
2085		Disminuida	-2.37
2135		Disminuida	-3.72
2140		Disminuida	-2.44
2142		Disminuida	-2.34
2194		Disminuida	-2.17
2214		Disminuida	-2.07
2220		Disminuida	-2.45
2257		Incrementada	3.78
2267		Incrementada	3.41
2278		Incrementada	5.36
2291	HSP60	Incrementada	14.25
2316		Disminuida	-2.14
2380		Incrementada	9.57
2431		Incrementada	4.94
2441		Incrementada	14.46
2469		Incrementada	2.02
2477		Incrementada	5.34
2520		Disminuida	-2.03
2577		Incrementada	5.76
2588		Incrementada	3.06
2610		Incrementada	27.55
2634		Incrementada	8.05
2742		Incrementada	2.22
2819		Incrementada	9.05
2858		Incrementada	4.6
2859		Incrementada	9.94
2914		Incrementada	1.99
2919		Incrementada	2.05
3096	Anexina A2	Incrementada	8.43
3103	Anexina A2	Incrementada	12.43
3409	40S proteína ribosomal SA	Incrementada	2.66
3589	HSP β-1	Disminuida	-2.86
3688		Incrementada	2
3799		Incrementada	7.93

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
4365		Incrementada	5.34
4437		Incrementada	7.02
4497		Incrementada	3.28
4943		Incrementada	1.98

TABLA 4. RELACIÓN DE SPOTS PROTEICOS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN LA COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE CULTIVOS PL45 EN MEDIO CONDICIONADO LC5 VERSUS MONO-CULTIVOS (PL45) MEDIANTE DIGE (PL45 C_CY2 / PL45 A_CY5)

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
635		Disminuida	-3.19
663		Disminuida	-3
843		Disminuida	-3.31
1176		Disminuida	-2.47
1456	Heat Shock Cognate 71 kDa protein	Incrementada	3.11
1462	Heat Shock Cognate 71 kDa protein	Incrementada	2.65
1590		Incrementada	2.62
1705		Incrementada	3.09
1811	HSP60	Disminuida	-2.61
2053		Disminuida	-3.12
2199	Actina citoplasmática 1	Disminuida	-2.54
2334		Disminuida	-3.42
2340		Disminuida	-5.25
2394		Disminuida	-5.87
2418		Disminuida	-3.99
2545	Anexina A2	Disminuida	-2.48
2688		Disminuida	-4.52
4267		Disminuida	-2.55
4426		Disminuida	-2.81

TABLA 5. RELACIÓN DE SPOTS PROTEICOS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN LA COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE CO-CULTIVOS (PL45 + FIBROBLASTOS LC5) VERSUS MONO-CULTIVOS (PL45) MEDIANTE DIGE (PL45B_CY3 / PL45A_CY5)

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
835		Incrementada	3.5
906		Incrementada	3.55
922		Incrementada	3.42
956	C-1 Tetrahidrofolato sintetasa, citoplasmática	Incrementada	3.06
990	Factor de elongación 2	Incrementada	2.99
1036	Factor de elongación 2	Incrementada	3.57
1102	ATPasa del retículo endoplasmático de transición	Incrementada	4.04
1291	Radixina	Incrementada	3.26
1368		Incrementada	3.07
1388	Proteína 78 kDa regulada por glucosa	Incrementada	3.52
1431	XRCC6	Incrementada	3.89
1450		Disminuida	-3.79
1451	Proteína de estrés 70, mitocondrial	Incrementada	4.06
1488	Heat Shock Cognate 71 kDa protein	Incrementada	3.65
1528	HSP70 1A/1B	Incrementada	3.58
1596	Fosfoproteína 1 inducida por estrés	Incrementada	3.12
1637		Incrementada	3.52
1654		Incrementada	3.45
1690	Complejo T, proteína 1, subunidad ε	Incrementada	3.26
1721	HSP60	Incrementada	4.4
1894		Incrementada	3.11
2214		Incrementada	3.57
2418		Disminuida	-3.53
2472		Disminuida	-3.27

TABLA 6. RELACIÓN DE SPOTS PROTEICOS CON DIFERENTE ABUNDANCIA EN LA COMPARACIÓN DE PROTEOMAS DE CO-CULTIVOS (PL45 + FIBROBLASTOS LC5) VERSUS CULTIVOS DE PL45 EN MEDIO CONDICIONADO LC5, MEDIANTE DIGE (PL45B_CY3 / PL45C_CY2).

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
446		Incrementada	3.87
523		Incrementada	3.86
662		Incrementada	4.71
663		Incrementada	6.28
835		Incrementada	5.76
841		Incrementada	5.55
843		Incrementada	8.3
883		Incrementada	3.97
906		Incrementada	4.04
913		Incrementada	4.57
922		Incrementada	7.82
949		Incrementada	4.12
956	C-1-Tetrahidrofolato sintetasa, citoplasmática	Incrementada	6.43
990	Factor de elongación 2	Incrementada	4.16
1036	Factor de elongación 2	Incrementada	7.43
1037		Incrementada	5.43
1102	ATPasa del retículo endoplasmático de transición	Incrementada	6.62
1176		Incrementada	4.05
1201		Incrementada	4.38
1215		Incrementada	3.86
1271		Disminuida	-4.05
1279		Incrementada	3.99
1291	Radixina	Incrementada	5.51
1367		Disminuida	-4.66
1368		Incrementada	6.12
1377		Incrementada	4.29
1388	Proteína 78 kDa regulada por glucosa	Incrementada	5.45
1431	XRCC6	Incrementada	7.03
1440		Incrementada	5.13
1450		Disminuida	-6.21
1451	Proteína de estrés 70, mitocondrial	Incrementada	5.61
1456	Heat Shock Cognate 71 kDa protein	Disminuida	-6.32
1475		Incrementada	4.27
1488	Heat Shock Cognate 71 kDa protein	Incrementada	4.84
1528	HSP70 1A/1B	Incrementada	5.22
1590		Disminuida	-3.84
1596	Fosfoproteína 1 inducida por estrés	Incrementada	5.84
1637		Incrementada	5.21
1654		Incrementada	5.35
1690	Complejo T, proteína 1, Subunidad ε	Incrementada	4.28

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
1692		Disminuida	-5.74
1701		Disminuida	-5.41
1721	HSP60	Incrementada	5.38
1784		Incrementada	4.19
1807		Incrementada	4.44
1811	HSP60	Incrementada	4.37
1874		Disminuida	-4.81
1986		Incrementada	3.98
2018		Incrementada	4.12
2053		Incrementada	4.15
2090		Incrementada	3.76
2214		Incrementada	8.03
2308		Incrementada	4.17
2394		Incrementada	4.05
2445		Disminuida	-4.23
2472		Disminuida	-4.73
2507		Disminuida	-4.69
2545	Anexina A2	Incrementada	4.01
3265		Disminuida	-4.16
3986		Disminuida	-3.9
4236		Disminuida	-4.43
4731		Disminuida	-4.43

TABLA 7. FIBROBLASTOS LC5 MONOCULTIVO VS CO-CULTIVO CON CAPAN-1.

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
569		Disminuida	-1,70
1691		Disminuida	-2,01
1694	α -actinina-4	Disminuida	-2,08
1916	Proteín-glutamina γ -glutamil-transferasa 2	Aumentada	2,08
2424	Tubulina, cadena α -1C	Disminuida	-1,71
2436	Tbulina, cadena β	Disminuida	-1,98
2456	Vimentina	Disminuida	-1,63
2461		Disminuida	-1,66
2465	Tubulina, cadena α -1B	Disminuida	-1,94
2657		Aumentada	1,76
2840		Aumentada	1,70
2862	Inhibidor de la elastasa leucocitaria	Aumentada	1,64
2973		Disminuida	-2,08
3134		Aumentada	2,13
3136		Aumentada	2,26
3339		Aumentada	1,67
3469		Aumentada	2,05
3543		Disminuida	-1,71
3581		Disminuida	-1,89
4406	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A	Aumentada	2,46

TABLA 8. FIBROBLASTOS LC5 MONO-CULTIVO VS CULTIVO CON MEDIO CONDICIONADO DE CAPAN-1

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
569		Disminuida	-1,69
1451		Aumentada	1,67
1465		Disminuida	-1,69
1691		Disminuida	-1,70
1694	α -actinina-4	Disminuida	-1,76
1702		Aumentada	1,87
2020	Piruvato kinasa PKM	Aumentada	1,80
2203		Aumentada	2,88
2204		Aumentada	3,63
2205		Aumentada	2,60
2355		Aumentada	1,82
3469		Aumentada	1,66
4999		Disminuida	-2,03

TABLA 9. FIBROBLASTOS LC5 Co-CULTIVO CON CAPAN-1 VS CULTIVO EN MEDIO
CONDICIONADO DE CAPAN-1

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
1495	Vimentina	Disminuida	-1,71
2203		Aumentada	2,41
2204		Aumentada	2,84
2205		Aumentada	2,54
2461		Aumentada	1,77
2465		Aumentada	2,26
2489		Aumentada	1,66
2764		Aumentada	1,81
2840		Disminuida	-1,92
2951		Aumentada	1,69
2990	PCNA (<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>)	Disminuida	-1,67
2991		Disminuida	-1,78
3134		Disminuida	-2,02
3136		Disminuida	-2,56
4597		Disminuida	-1,66
5002		Disminuida	-1,90
5026		Disminuida	-1,68

TABLA 10. FIBROBLASTOS LC5 MONO-CULTIVO VS CO-CULTIVO CON PL-45.

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
1607		Aumentada	1,57
1643	Adenosil homocisteinasa	Disminuida	-1,49
1741		Aumentada	1,56
2115	Tubulina, cadena β	Disminuida	-1,61
2141	Glucosa-6-fosfato-1 deshidrogenasa	Disminuida	-1,57
2320		Aumentada	1,97
2392		Disminuida	-1,51
2632		Disminuida	-1,66
2638	Anexina A1	Disminuida	-1,60
2649		Aumentada	1,50
2804		Aumentada	2,55
3194		Disminuida	-1,50
3319	Peróxido-reductasa mitocondrial, dependiente de tioredoxina	Aumentada	1,73
3737	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa B	Aumentada	1,53
4452		Disminuida	-1,51
4813		Aumentada	1,67
4820		Disminuida	-1,79
4821		Disminuida	-1,56

TABLA 11. FIBROBLASTOS LC5: MONOCULTIVOS VS CULTIVO CON MEDIO CONDICIONADO DE PL45

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
1096		Disminuida	-1,83
1100		Disminuida	-1,92
1133		Disminuida	-1,81
1786		Aumentada	1,95
1840		Aumentada	3,27
1841		Aumentada	2,28
1844		Aumentada	1,77
2105		Aumentada	2,38
2195		Aumentada	1,82
2207		Aumentada	1,77
2214	ATP sintasa subunidad α , mitocondrial	Aumentada	1,81
2317		Aumentada	2,00
2320		Aumentada	2,20
2392		Aumentada	1,78
2440		Disminuida	-1,76
2804		Aumentada	2,06

TABLA 12. FIBROBLASTOS LC5 CRECIDOS CON SECRETOMA DE PL45 VS CO-CULTIVADOS CON PL45

Spot No.	Proteína	Abundancia	Ratio
1100		Aumentada	1,89
1786		Disminuida	-2,34
1840		Disminuida	-3,40
1841		Disminuida	-2,30
1844		Disminuida	-1,90
2091	Proteín disulfuro isomerasa A3	Disminuida	-1,95
2194		Disminuida	-1,87
2195		Disminuida	-2,35
2392		Disminuida	-2,70
2638		Disminuida	-2,04
3175		Disminuida	-1,79
3404	Peroxirredoxina-2	Disminuida	-1,90

